Série de la Protection de l'environnement

Méthode d'essai biologique :

essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule

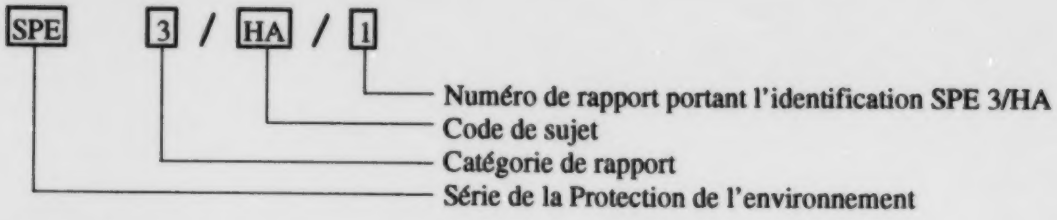
Rapport SPE 1/RM/22
Février 1992

Canada

Environnement Canada | Environment Canada

SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Exemple de numérotation :



Catégories

1 Règlements/Lignes directrices/ Codes de pratiques
2 Évaluation des problèmes et options de contrôle
3 Recherche et développement technologique
4 Revues de la documentation
5 Inventaires, examens et enquêtes
6 Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux
7 Surveillance
8 Propositions, analyses et énoncés de principes généraux
9 Guides

Sujets

AG Agriculture
AN Technologie anaérobie
AP Polluants atmosphériques
AT Toxicité aquatique
CC Produits chimiques commerciaux
CE Consommateurs et environnement
CI Industries chimiques
FA Activités fédérales
FP Traitement des aliments
HA Déchets dangereux
IC Chimie inorganique
MA Pollution marine
MM Exploitation minière et traitement des minéraux
NR Régions du Nord et rurales
PF Papier et fibres
PG Production d'électricité
PN Pétrole et gaz naturel
RA Réfrigération et climatisation
RM Méthodes de référence
SF Traitements de surface
SP Déversements de pétrole et de produits chimiques
SRM Méthodes de référence normalisées
TS Systèmes de transport
TX Textiles
UP Pollution urbaine
WP Protection/préservation du bois

Des sujets et des codes additionnels sont ajoutés au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la SPE en s'adressant aux Publications de la Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

Printed on recycled paper

Imprimé sur du papier recyclé

92-04309/

Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule

Protection de l'environnement
Conservation et Protection
Environnement Canada

Rapport SPE 1/RM/22
Février 1992

Données de catalogage avant publication (Canada)

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique. Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule

(Rapport ; SPE 1/RM/22)
Publ. aussi en anglais sous le titre: Biological test method, test of larval growth and survival using fathead minnows.
Comprend un résumé en anglais.
Comprend des références bibliographiques.
ISBN 0-662-97303-8
No. de cat. MAS En49-24/1-22F

1. Tête-de-boule (Poisson) -- Larves -- Essais -- Normes -- Canada. 2. Effluents -- Qualité -- Essais -- Normes -- Canada. 3. Environnement -- Surveillance -- Canada. I. Canada. Direction générale de la protection de l'environnement. II. Canada. Environnement Canada. III. Coll.: Rapport (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/22.

QL638.C94B6614 1992 597.'52 C92-099587-X

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1992
N° de cat. En 49-24/1-22F
ISBN 0-662-97303-8

Commentaires

Pour formuler des commentaires sur la teneur du présent rapport, s'adresser à :

M. Gary Sergy
Direction du développement technologique
Environnement Canada
4999, 98^{e} avenue, pièce 210
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

M. Richard Scroggins
Direction des programmes industriels
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English under the title *Biological Test Method : Test of Larval Growth and Survival Using Fathead Minnows*. For copies, please contact:

Environmental Protection Publications
Conservation and Protection
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Résumé

*Le présent document expose les méthodes recommandées par Environnement Canada pour l'exécution d'essais de toxicité d'une durée de sept jours qui permettent de mesurer la croissance et la survie de têtes-de-boule (*Pimephales promelas*) au stade larvaire. Étant donné que ce premier stade constitue normalement une partie sensible du cycle biologique d'un poisson, on devrait considérer cet essai comme un essai sublétal puissant et significatif. On peut procéder à l'essai avec cinq concentrations de la substance à expérimenter afin de déterminer le seuil d'effet, ou avec une seule concentration à titre d'essai réglementaire à résultat unique (réussite ou échec).*

Ce document présente des méthodes pour l'élevage de têtes-de-boule en laboratoire, l'obtention d'oeufs et l'éclosion de larves devant servir aux essais. Il présente les conditions et méthodes générales ou universelles permettant de réaliser des essais sur un large éventail de substances pour déterminer leur effet sur la croissance et sur la mortalité des larves. On y précise aussi d'autres conditions et méthodes propres à l'évaluation d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs. Le lecteur y trouvera des instructions et des exigences concernant les installations d'essai, la manipulation et le stockage des échantillons, la préparation des solutions d'essai et la mise en route des essais, les conditions prescrites pour les essais, les observations et mesures appropriées, les résultats des essais, les méthodes de calcul et l'utilisation de produits toxiques de référence.

Abstract

*Methods recommended by Environment Canada for performing toxicity tests of seven days' duration, that measure growth and survival of very young (larval) fathead minnows (*Pimephales promelas*) are described in this report. Because such early life-stages are usually a sensitive part of the life cycle of a fish, the test should be considered as a powerful and meaningful sublethal assay. The test may be run with five concentrations of test material to determine the threshold of effect, or with one concentration as a regulatory or pass/fail test.*

Procedures are given for culturing fathead minnows in the laboratory, obtaining eggs, and hatching the young for use in the tests. General or universal conditions and procedures are outlined for testing a variety of materials for their effects on larval growth and mortality. Additional specific conditions and procedures are stipulated for testing samples of chemicals, effluents, elutriates, leachates, or receiving waters. Instructions and requirements are included on test facilities, handling and storing samples, preparing test solutions and initiating tests, specific test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints and methods of calculation, and the use of reference toxicants.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une série de ***méthodes recommandées*** *pour mesurer et évaluer les effets bioaquatiques de substances toxiques. Ces méthodes ont été évaluées par Conservation et Protection et sont recommandées pour les applications suivantes :*

- *utilisation dans les laboratoires de toxicité aquatique de Conservation et Protection;*
- *essais confiés à des entrepreneurs par Environnement Canada ou demandés à des organismes ou à des entreprises de l'extérieur;*
- *remplacement d'instructions plus précises, comme celles prévues dans des règlements; et*
- *fondement pour l'établissement d'instructions très explicites devant figurer, en certaines circonstances, dans un protocole juridique ou une méthode de référence normalisée.*

Les différents types d'essais compris dans cette série ont été choisis parce qu'ils étaient acceptables aux fins des programmes de protection et de gestion de l'environnement mis en oeuvre par Environnement Canada. Ces documents visent à fournir des lignes directrices et à faciliter l'utilisation de méthodes cohérentes, pertinentes et exhaustives pour recueillir des données sur les effets toxiques d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats, de milieux récepteurs ou, le cas échéant, de sédiments.

Dans le présent document, la mention d'appellations commerciales ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable peuvent être utilisés.

Table des matières

Résumé v
Abstract vi
Avant-propos vii
Liste des tableaux xii
Liste des figures xii
Liste des abréviations et des formules chimiques xiii
Glossaire xv
Remerciements xxiii

Section 1
Introduction 1
1.1 Contexte 1
1.2 Description de l'espèce et utilisation antérieure pour des essais 1

Section 2
Organismes soumis à l'essai 6
2.1 Espèce et stade du cycle biologique 6
2.2 Source 6
2.3 Élevage 7
2.3.1 Généralités 7
2.3.2 Installations 7
2.3.3 Éclairage 9
2.3.4 Eau 10
2.3.5 Température 12
2.3.6 Oxygène dissous 12
2.3.7 pH 12
2.3.8 Croissance et reproduction des poissons 12
2.3.9 Alimentation 15
2.3.10 Nettoyage des réservoirs 16
2.3.11 Morbidité, mortalité et traitement des poissons 16

Section 3
Système d'essai 18
3.1 Installations et appareillage 18
3.2 Éclairage 18
3.3 Récipients d'essai 18
3.4 Eau de contrôle/de dilution 19

Section 4
Méthodes universelles 20
4.1 Préparation des solutions d'essai 20
4.2 Mise en route de l'essai 23
4.3 Conditions de l'essai 26

4.3.1 Oxygène dissous et aération **27**
4.3.2 pH **28**
4.3.3 Alimentation **30**
4.3.4 Renouvellement des solutions d'essai **30**
4.4 Observations et mesures **31**
4.5 Résultats et calculs **32**
4.6 Produits toxiques de référence **37**
4.7 Considérations juridiques **39**

Section 5
Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques **40**
5.1 Propriétés, étiquetage et stockage des échantillons . . **40**
5.2 Préparation des solutions d'essai **40**
5.3 Eau de contrôle/de dilution **41**
5.4 Observations et mesures **42**
5.5 Résultats et calculs **43**

Section 6
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats **44**
6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons **44**
6.2 Préparation des solutions d'essai **45**
6.3 Eau de contrôle/de dilution **45**
6.4 Conditions de l'essai **46**
6.5 Observations et mesures **47**
6.6 Résultats et calculs **47**

Section 7
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs **49**
7.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons **49**
7.2 Préparation des solutions d'essai **49**
7.3 Eau de contrôle/de dilution **49**
7.4 Observations et mesures **50**
7.5 Résultats et calculs **50**

Section 8
Procès-verbal de l'essai **51**
8.1 Substance à expérimenter **51**
8.2 Organismes soumis à l'essai **51**
8.3 Installations et appareillage **52**
8.4 Eau de contrôle/de dilution **52**
8.5 Méthode d'essai **52**

8.6 Conditions de l'essai **52**
8.7 Résultats de l'essai **53**

Références **54**

Annexe A
Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique **61**

Annexe B
Adresses de l'Administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection **63**

Annexe C
Utilisation d'artémias pour l'alimentation de la tête-de-boule **65**

Annexe D
Série logarithmique de concentrations convenant aux essais de toxicité **67**

Annexe E
Analyse de la mortalité en vue de l'estimation de la concentration létale 50 . . . . . **69**

Liste des tableaux

1 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour l'élevage de la tête-de-boule . . . 8

2 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées 21

Liste des figures

1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances 2

2 Aspect général de têtes-de-boule mâle et femelle ayant atteint la maturité sexuelle et d'une larve environ quatre jours après l'éclosion 14

3 Vue dorsale de larves de tête-de-boule 25

Liste des abréviations et des formules chimiques

°C . . . . . degré Celsius

$CaCO_3$ . . . . . carbonate de calcium

CI_p . . . . . concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné

CL . . . . . concentration létale

CL_{50} . . . . . concentration létale 50

cm . . . . . centimètre

CMEO . . . . . concentration minimale avec effet observé

CSE . . . . . concentration seuil d'effet

CSEO . . . . . concentration sans effet observé

d . . . . . jour

DSM . . . . . différence significative minimale

g . . . . . gramme

g/kg . . . . . gramme par kilogramme

h . . . . . heure

HCl . . . . . acide chlorhydrique

H_2O . . . . . eau

L . . . . . litre

m . . . . . mètre

MC . . . . . marque de commerce

mg . . . . . milligramme

min . . . . . minute

mL . . . . . millilitre

mm . . . . . millimètre

mS . . . . . millisiemens

N . . . . . normal

NaOH . . . . . hydroxyde de sodium

OD . . . . . oxygène dissous (concentration)

P . . . . . probabilité

SI . . . . . Système international d'unités

sp. . . . . espèce

TL_{50} . . . . . temps létal 50

µg . . . . . microgramme

µm . . . . . micromètre

> . . . . . supérieur à

< . . . . . inférieur à

≥ . . . . . supérieur ou égal à

≤ . . . . . inférieur ou égal à

± . . . . . plus ou moins

% . . . . . pour cent

‰ . . . . . pour mille

Glossaire

Remarque : Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux méthodes énoncées dans le présent rapport; il se pourrait qu'elles ne soient pas adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit (doivent)* est utilisé pour exprimer une obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait (devraient)* et le conditionnel d'obligation (*il faudrait*, etc.) sont utilisés pour indiquer que la condition ou la méthode en cause est recommandée et doit être respectée dans la mesure du possible.

L'auxiliaire *peut (peuvent)* indique qu'on est autorisé à faire une chose ou en mesure de la faire.

Termes techniques généraux

Acclimatation - Adaptation physiologique à un niveau précis d'une ou de plusieurs variables environnementales, par exemple la température. Ce terme s'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

Conductivité - Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de transporter un courant électrique. Cette capacité dépend de la concentration, de la valence et de la mobilité des ions en solution, ainsi que de la température de la solution. La conductivité s'exprime normalement en millisiemens par mètre (unité SI), ou en micromhos par centimètre (1 mS/m = 10 µmho/cm).

Conformité - Fait de respecter les exigences du gouvernement en matière de réglementation ou de délivrance de permis.

Croissance - Accroissement de taille ou gain de poids résultant de la prolifération de nouveaux tissus. Dans le présent document, le sens de ce terme est limité à l'accroissement du poids sec.

Différence significative minimale (DSM) - Différence entre les groupes (dans le présent essai sur la tête-de-boule, différence des poids moyens ou des mortalités moyennes) qui devrait exister avant que l'on puisse conclure à une différence significative entre les groupes. La DSM s'obtient par le test à

comparaisons multiples de Dunnett, une méthode statistique normalisée.

Dispersant - Substance chimique qui réduit la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex., du pétrole), ce qui facilite la dispersion de cette substance dans l'eau sous forme d'émulsion.

Dureté - Concentration, dans l'eau, de cations réagissant avec une solution savonneuse de sodium pour entraîner la précipitation d'un résidu insoluble. En règle générale, la dureté correspond à la concentration d'ions de calcium et de magnésium dans l'eau et s'exprime en mg/L de carbonate de calcium ou l'équivalent.

Élevage - Ensemble des animaux qu'on élève dans des conditions définies et contrôlées afin d'obtenir des organismes sains en vue d'essais. Activité visant à obtenir ces ensembles.

Embryon - Jeune poisson non développé, avant son éclosion de l'oeuf. Dans les documents relatifs à la tête-de-boule, on parle généralement d'«embryon» plutôt que d'«oeuf».

Émulsifiant - Substance chimique qui facilite le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l'eau, d'une substance normalement hydrophobe.

Floculation - Formation d'un précipité léger en suspension (floc) dans une solution.

Larve - Poisson récemment éclos qui possède des caractéristiques physiques différentes de celles observées chez le poisson adulte. La période larvaire commence avec l'éclosion de l'embryon et dure jusqu'à la disparition du dernier vestige du pli de la nageoire impaire et à l'apparition d'un ensemble complet de rayons de nageoires et d'épines. On considère que les têtes-de-boule sont larvaires pendant les quelques jours qui suivent leur éclosion.

Lux - Unité SI d'éclairement, mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,0929 pied-bougie; 1 pied-bougie = 10,76 lux.

Nauplius - Stade larvaire le plus précoce caractéristique de nombreux crustacés marins et de certains autres invertébrés. Le nauplius est microscopique, nage librement et ne possède que trois paires d'appendices et un oeil médian à l'avant de la tête.

pH - Logarithme négatif de l'activité des ions d'hydrogène, mesurée par leur concentration en moles par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines selon une échelle de 0 à 14, où le nombre 7 représente la neutralité et les nombres inférieurs correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes; les chiffres supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

Photopériode - Durée d'éclairage et d'obscurité au cours d'un cycle de 24 h.

Pourcentage (%) - Concentration exprimée en parties par centaine. Un pour cent représente une unité ou partie d'une substance (p. ex., effluent, élutriat, lixiviat ou milieu récepteur) diluée dans l'eau, jusqu'à concurrence de 100 parties. On peut préparer des concentrations en volume (*V/V*) ou en masse (*m/m*). On les exprime en pourcentage de la substance à expérimenter dans la solution finale.

Précipitation - Formation d'un solide (précipité) à partir d'une solution.

Prétraitement - Dans le présent rapport, traitement d'un échantillon ou de sa dilution avant l'exposition des poissons.

Salinité - Quantité totale, en grammes, de solides dissous dans 1 kg d'eau de mer. Elle se détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toutes les matières organiques. La salinité peut aussi se mesurer directement grâce à un salinimètre/conductimètre ou par d'autres moyens (APHA *et al.*, 1989). Elle s'exprime habituellement en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰).

Surveillance - Activités de vérification de la qualité ou de collecte et de communication de données, effectuées de façon régulière (p. ex., quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimestrielle). Dans le contexte du présent rapport, ce terme s'applique soit à la vérification et à la mesure périodiques de certaines variables biologiques ou relatives à la qualité de l'eau, soit au prélèvement et à l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs pour la mesure de leur toxicité.

Turbidité - Degré de réduction de la clarté de l'eau par la présence de matières en suspension ou autres qui entraînent la diffusion et l'absorption de la lumière, plutôt que sa transmission en ligne droite dans l'échantillon. La turbidité s'exprime généralement en unités de turbidité néphélométrique.

Termes désignant les substances servant aux essais

Contrôle - Traitement reproduisant l'ensemble des conditions et facteurs qui pourraient influencer les résultats d'une enquête ou d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans un essai de toxicité aquatique, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, sans porter sur la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de toxicité mesurable en raison des conditions de base de l'essai (p. ex., qualité de l'eau de dilution, santé ou manipulation des organismes soumis à l'essai).

Eau d'amont - Eau de surface (p. ex., d'un ruisseau, d'une rivière ou d'un lac) qui n'est pas soumise à l'influence d'un effluent (ou d'une autre substance à expérimenter), du fait qu'elle se trouve contre le courant ou assez loin perpendiculairement à celui-ci.

Eau de contrôle/de dilution - Eau utilisée pour le contrôle, pour diluer la substance à expérimenter ou pour l'une et l'autre de ces fins.

Eau de dilution - Eau utilisée pour diluer la substance à expérimenter afin d'en préparer différentes concentrations en vue des divers traitements prévus dans le cadre des essais de toxicité.

Eau déchlorée - Eau chlorée (généralement, eau potable municipale) qu'on a traitée afin d'en éliminer le chlore et ses composés.

Eau désionisée - Eau qu'on a purifiée pour en extraire les ions en la faisant circuler dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

Eau distillée - Eau qu'on a traitée au moyen d'un appareil de distillation (au verre borosilicaté ou autre) pour en éliminer les impuretés.

Eau reconstituée - Eau désionisée ou distillée au verre à laquelle des produits chimiques de qualité «réactif» ont été ajoutés. L'eau douce synthétique qui en résulte est exempte de contaminants et possède le pH et la dureté souhaités.

Eaux usées - Terme général englobant les effluents, les lixiviats et les élutriats.

Effluent - Tout déchet liquide (p. ex., industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique.

Élutriat - Solution aqueuse obtenue après avoir ajouté de l'eau à un déchet solide (p. ex., sédiments, stériles ou boues de forage ou de dragage), avoir agité le mélange, puis l'avoir centrifugé ou filtré ou avoir décanté le surnageant.

Lixiviat - Eau ou eau usée ayant traversé une colonne de sol ou de déchets solides dans l'environnement.

Milieu récepteur - Eau de surface (p. ex., d'un ruisseau, d'une rivière ou d'un lac) qui a reçu un rejet de déchet ou qui est sur le point d'en recevoir un (p. ex., immédiatement en amont du point de rejet). D'autres termes doivent être employés afin de préciser lequel de ces deux sens s'applique dans le contexte.

Produit chimique - Dans le présent rapport, se dit de tout élément, composé, formule ou mélange de substances chimiques qui pourrait se retrouver dans l'environnement aquatique par déversement, application ou rejet. Les insecticides, les herbicides, les fongicides, les larvicides employés contre la lamproie marine et les agents de traitement des déversements de pétrole sont des exemples de produits chimiques qui se retrouvent dans l'environnement.

Produit toxique de référence - Produit chimique étalon utilisé pour mesurer la sensibilité des organismes soumis à l'essai afin d'établir les limites de confiance des données de toxicité recueillies sur une substance à expérimenter. Dans la plupart des cas, on procède à un essai de toxicité sur un produit toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment de l'étude d'une substance à expérimenter, ainsi que la précision des résultats obtenus par le laboratoire pour ce produit.

Solution mère - Solution aqueuse concentrée de la substance à expérimenter. Des volumes mesurés de la solution mère sont ajoutés à l'eau de dilution afin de préparer les solutions d'essai aux concentrations requises.

Termes de toxicologie

Aigu - Qui a lieu dans un bref intervalle par rapport à la durée de la vie de l'organisme, généralement quatre jours ou moins dans le

cas des poissons. Un effet toxique aigu serait provoqué et observable au cours de ce bref intervalle.

Chronique - Qui a lieu dans un intervalle d'exposition relativement prolongé correspondant généralement à une partie importante de la durée de la vie de l'organisme, par exemple 10 % ou plus.

CI_p - Concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné. Il s'agit d'une estimation ponctuelle de la concentration à laquelle la substance à expérimenter provoque une réduction donnée d'une fonction biologique de caractère quantitatif, comme la croissance de poissons. Par exemple, une CI_{25} pourrait être la concentration qui causerait une réduction de 25 % de la croissance de larves de poissons soumises à l'essai, par rapport à la croissance d'organismes témoins. Cette expression devrait être appliquée à tout essai toxicologique qui sert à mesurer la variation d'une mesure relative, comme le taux de reproduction, la vitesse de croissance ou la fréquence respiratoire. (L'expression CE_{50}, ou concentration efficace 50, ne s'emploie que pour des mesures absolues, comme le nombre de sujets chez lesquels on observe un effet particulier.)

CL_{50} - Concentration létale 50 (ou médiane). Il s'agit de la concentration d'une substance dans l'eau qu'on estime létale pour 50 % des organismes soumis à l'essai. La CL_{50} et ses limites de confiance à 95 % sont généralement obtenues par analyse statistique de la mortalité à plusieurs concentrations d'essai, après une durée d'exposition donnée. Cette durée doit être précisée (p. ex., CL_{50} après sept jours).

CMEO - Concentration minimale avec effet observé. Il s'agit de la plus faible concentration d'une substance à expérimenter qui, lorsque des organismes y sont exposés, provoque chez eux des effets nocifs qui sont détectés par l'observateur et sont statistiquement significatifs. Par exemple, la CMEO pourrait être la plus faible concentration à laquelle la croissance de poissons soumis à l'essai diffère significativement de celle d'organismes témoins. La CMEO s'applique généralement aux effets sublétaux mais peut aussi s'appliquer à la mortalité, qui pourrait parfois être l'effet le plus sensible observé.

CSE - Concentration seuil d'effet. Il s'agit de la moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO. «Seuil de toxicité chronique» ou «seuil de toxicité subchronique» sont d'autres termes qu'on pourrait utiliser, selon la durée de l'exposition.

CSEO - Concentration sans effet observé. Il s'agit de la plus forte concentration d'une substance qui, lorsque des organismes y sont exposés, ne provoque chez eux aucun effet nocif observé et statistiquement significatif. Par exemple, la CSEO pourrait être la plus forte concentration à laquelle la croissance de poissons soumis à l'essai ne diffère pas significativement de celle d'organismes témoins. La CSEO s'applique habituellement aux effets sublétaux et, sauf indication contraire, au plus sensible d'entre eux.

Essai à renouvellement continu - Essai de toxicité pendant lequel les solutions des réservoirs d'essai sont renouvelées en continu par l'apport constant d'une solution fraîche ou par un apport intermittent fréquent.

Essai à renouvellement périodique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai sont renouvelées périodiquement, généralement à intervalles de 24 h.

Essai de toxicité - Détermination de l'effet d'une substance sur un groupe d'organismes choisis, dans des conditions définies. Un essai de toxicité aquatique permet généralement de mesurer soit le nombre d'organismes affectés par l'exposition à des concentrations particulières de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs (mesure absolue), soit l'intensité des effets observés (mesure relative).

Essai statique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées.

Évaluation d'identification de la toxicité - Prétraitement systématique d'un échantillon (p. ex., ajustement du pH, filtrage, aération), suivi d'un essai de toxicité. Cette évaluation permet de définir les agents qui sont les principaux responsables de la toxicité dans un mélange complexe. L'essai de toxicité peut être létal ou sublétal.

Létal - Qui entraîne la mort par action directe. Dans le cas de poissons, on entend par «mort» la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité.

Résultat - Variable (p. ex., le délai, la réaction des organismes soumis à l'essai) indiquant la fin d'un essai; mesure ou valeur dérivée caractérisant l'effet de la substance à expérimenter (CMEO, CL_{50}, CI_p, etc.).

Seuil de toxicité chronique - Moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO lors d'essais comportant une exposition chronique. *Cf.* CSE, qui est le terme recommandé.

Sublétal - Nocif pour les poissons, mais en deçà du niveau qui entraîne directement la mort pendant la durée de l'essai.

TL_{50} - Temps létal 50 (ou médian). Il s'agit de la durée d'exposition qui causerait 50 % de mortalité au sein d'un groupe de poissons détenus dans une solution d'essai particulière. Cette valeur est estimée par une représentation graphique puisqu'il n'existe pas de technique informatique ou mathématique normalisée qui soit d'usage courant (*cf.* annexe E).

Toxicité - Capacité propre d'une substance de provoquer des effets nocifs chez des poissons ou d'autres organismes. Les effets pourraient être létaux ou sublétaux.

Toxicité chronique - Effets à long terme liés à des modifications d'éléments tels que le métabolisme, la croissance, la reproduction, la survie ou l'aptitude à la survie.

Remerciements*

Le présent document a été rédigé en collaboration par J.B. Sprague (Sprague Associates Ltd., Guelph, Ont.) et D.J. McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.). Il est basé sur des méthodes mises au point aux États-Unis (Norberg et Mount, 1985; Denny, 1987; EPA, 1989) et, en Ontario, par M. C.M. Neville (1989), du ministère de l'Environnement de l'Ontario. MM. G.A. Sergy et R.P. Scroggins (Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada) ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont apporté leur collaboration et leurs conseils techniques pendant la durée des travaux.

Les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA) (cf. *annexe A) ont participé activement à l'élaboration et à l'examen du document et méritent tous nos remerciements. Nous tenons à souligner en particulier l'apport technique des membres du sous-comité du GITA qui a assumé la responsabilité de la première et de la dernière révisions [G.R. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton, Ont.); T. Kovacs (Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire, QC); C.M. Neville (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale, Ont.); et T.J. Norberg-King (Environmental Protection Agency, Duluth, MN)]; et celui R.P Scroggins, G.A Sergy et J.D. Somers, membres du GITA. Nous tenons également à remercier les équipes des laboratoires d'essai du ministère de l'Environnement de l'Ontario à Rexdale (Ont.) et d'Environnement Canada* (cf. *annexe B).*

Les personnes suivantes, qui ont passé en revue la version définitive ou des versions antérieures, ont apporté des observations et des conseils à la fois nombreux et utiles : W.J. Birge et J.R. Lauth (département des sciences biologiques, University of Kentucky, Lexington, KY); B.J. Boros-Russo et J.T. Reading (New Jersey Department of Environmental Protection, Trenton, NJ); C. Chiles (Pollutech Environmental Ltd., Sarnia, Ont.); U.M. Cowgill (Dow Chemical, Midland, MI); S.S. Crawford (département de zoologie), J.J. Hubert (département de mathématiques et de statistique), R.C. Moccia (département de sciences animales et avicoles) et R.C. Robinson (département de biologie de l'environnement), tous

* Les illustrations de la page couverture ont été fournies par T. Norberg-King (EPA, Environmental Research Laboratory, Duluth, MN) et P. Orr (Beak Consultants Ltd., Brampton, Ont.).

de l'Université de Guelph, Ont.; D.G. Dixon (département de biologie, Université de Waterloo, Ont.); F. Fulk, J.R. Lazorchak et M. Smith (EPA, Cincinnati, OH); D.G. Hutton (E.I. du Pont de Nemours, Newark, DE); E. Jonczyk (Beak Consultants Ltd., Brampton, Ont.); P.E. Kapteyn (Centre canadien des eaux intérieures, Burlington, Ont.); D.J. McCauley (Battelle, Traverse City, MI); W.R. Parker, membre du GITA; L.P. Parrish (EPA, Denver, CO); W.H. Peltier (EPA, Athens, GA); et G.W. Suter II (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN).

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs, on se sert d'essais de toxicité aquatique pour mesurer, prévoir et contrôler le rejet de substances potentiellement nocives pour les formes de vie aquatique. On ne peut s'attendre à ce qu'un seul organisme ou une seule méthode d'essai répondent aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement. C'est pourquoi le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (*cf.* annexe A) a proposé une série d'essais de toxicité aquatique qui seraient généralement acceptables et qui permettraient de mesurer différents types d'effets toxiques chez des organismes représentatifs de différents niveaux trophiques et groupes taxinomiques (Sergy, 1987). Un essai mesurant la croissance et la mortalité de larves de tête-de-boule était l'un des essais de toxicité aquatique qu'on a choisi de normaliser de sorte qu'ils permettent de respecter les exigences d'Environnement Canada en matière d'essais.

Le présent rapport décrit des méthodes universelles qui s'appliquent à tout essai sur des larves de tête-de-boule mené en laboratoire. Il présente également des ensembles particuliers de conditions et de méthodes, prescrits ou recommandés lorsqu'on applique cet essai à l'évaluation de différents types de substances (à savoir des échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs) (*cf.* figure 1). Les méthodes et conditions applicables à la conduite de l'essai sont définies et, au besoin, expliquées dans des notes en bas de page.

En mettant au point ces méthodes, on s'est efforcé de mettre en balance des considérations scientifiques, pratiques et financières, en plus de veiller à ce que les résultats soient assez exacts et précis pour la majorité des cas d'application des méthodes. Les auteurs ont supposé que le lecteur connaît déjà, dans une certaine mesure, les essais de toxicité aquatique. Le présent document ne renferme pas d'instructions explicites comme celles qui pourraient s'avérer nécessaires dans un protocole réglementaire particulier; néanmoins, il est destiné à servir de document d'orientation pour cette application et d'autres utilisations.

1.2 Description de l'espèce et utilisation antérieure pour des essais

La tête-de-boule appartient à la famille des cyprinidés, regroupant les carpes et les ménés, qui est la principale famille de poissons d'eau douce pour ce qui est du nombre d'espèces. On dénombre 44 espèces de cette famille au Canada, la plupart d'entre elles étant des petits ménés d'apparence similaire à celle de la tête-de-boule. La longueur maximale de la tête-de-boule au Canada est de 8,3 à 9,4 cm, les femelles adultes étant plus petites et mesurant normalement de 4 à 7 cm (Andrews et Flicklinger, 1973; Scott et Crossman, 1973). Un poisson mâle de 7 cm pèse de 3,5 à 5 g, selon son état nutritionnel, et un poisson femelle de 5 à 6 cm pèse entre 1,5 et 2 g (Benoit et Carlson, 1977; Korver et Sprague, 1989).

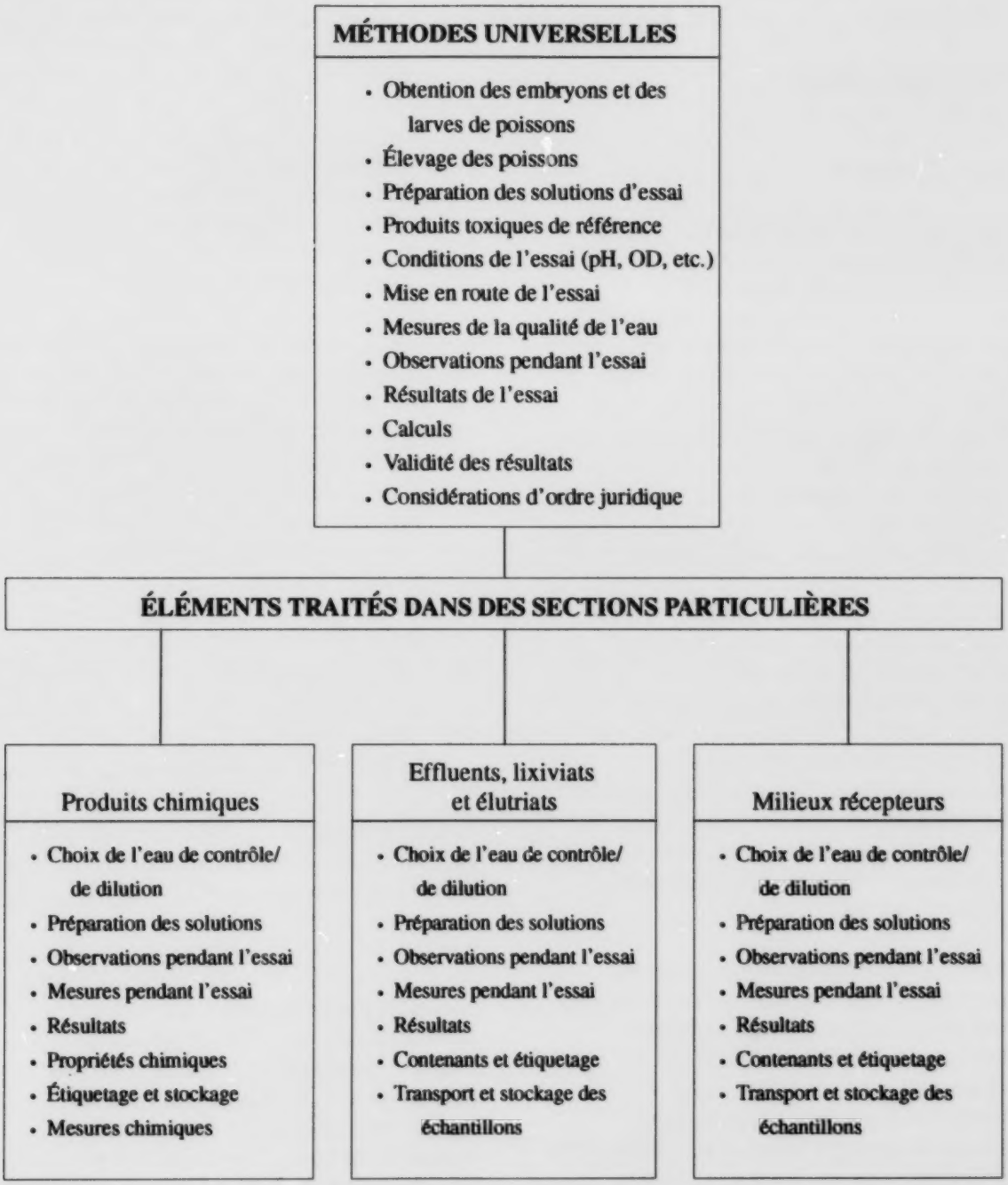


Figure 1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances

La tête-de-boule (*Pimephales promelas*) est un poisson indigène de la plupart des régions du Canada. Son aire de répartition touche les Territoires du Nord-Ouest (bassin versant méridional du Grand lac des Esclaves), couvre la majeure partie de l'Alberta, les deux tiers (au sud) de la Saskatchewan et du Manitoba, la majeure partie de l'Ontario (jusqu'à la baie d'Hudson), le sud-ouest du Québec et l'extrémité nord-ouest du Nouveau-Brunswick. Vers le sud, son aire de répartition se rétrécit dans la partie centrale des États-Unis et atteint le nord du Mexique (Scott et Crossman, 1973). Ce poisson ne se retrouve pas à l'ouest des Rocheuses ni dans les trois provinces les plus orientales de l'Atlantique, et il faudrait obtenir un permis avant de l'introduire dans un laboratoire de ces régions (*cf.* 2.2). La tête-de-boule prospère dans les étangs, les lacs, les fossés et les ruisseaux lents et boueux ainsi que dans les lacs alcalins ou salins comme ceux qu'on trouve en Saskatchewan. Il s'agit d'un poisson omnivore qui se nourrit de tout ce qu'il rencontre, des invertébrés vivants aux détritus, mais qui est bien adapté à un régime alimentaire à forte teneur en matières végétales.

La tête-de-boule commence à frayer en mai ou en juin dans la partie septentrionale de son aire de répartition, lorsque la température moyenne de l'eau n'est encore que de 13 à 17 °C. La température et la photopériode semblent jouer toutes deux un rôle dans le déclenchement du frai, qui peut se poursuivre durant tout l'été et prendre fin en août ou en septembre (Andrews et Flickinger, 1973).

Durant le frai, la tête-de-boule mâle choisit un objet en saillie (rondin ou rocher), le nettoie et le défend ainsi que le territoire qui l'entoure. Les femelles sont autorisées à y pénétrer pour frayer sur la surface inférieure de l'objet; le mâle assure ensuite la garde et le nettoyage des oeufs. Le nettoyage est important car il empêche la croissance de champignons sur les oeufs. Une femelle peut produire entre 1 000 et 10 000 oeufs par saison, selon les conditions, et peut en déposer de 300 à 500 à la fois. Ces caractéristiques rendent cette espèce idéale pour les études en laboratoire, car le mâle adopte alors comme territoire de frai une section inversée d'une tuile semi-circulaire et l'expérimentateur peut facilement trouver et récupérer les embryons pour les compter ou pour obtenir de jeunes poissons. La tête-de-boule est en fait un bon poisson de laboratoire ou d'aquarium, qui s'acclimate facilement à ce mode de vie et s'adapte bien aux aliments séchés commerciaux pour poissons, aux artémias, etc. Cette espèce est couramment élevée dans des étangs aux États-Unis pour servir de poisson d'appât (Brauhn *et al.*, 1975).

Aux États-Unis, la tête-de-boule sert à des essais de toxicité couvrant l'ensemble de son cycle biologique depuis les années 1960 (Mount et Stephan, 1967), et elle est à présent une espèce étalon pour les essais sur la létalité aiguë et les effets sublétaux ou chroniques (EPA, 1989). Une banque de données toxicologiques d'une taille appréciable a été constituée pour cette espèce.

L'essai de sept jours sur les larves de poisson est un essai sublétal sensible, mais sa durée est courte par rapport à la durée de vie du poisson; il ne s'agit donc pas d'un essai chronique. Il pourrait ne pas permettre d'estimer avec exactitude les résultats d'expositions plus longues (Suter, 1990; Norberg-King, 1990). Cependant, il est sensible parce que le stade larvaire compte normalement parmi les stades les plus vulnérables de l'ensemble du cycle biologique (Woltering, 1984; McKim, 1985;

Norberg et Mount, 1985; Suter *et al.*, 1987; Norberg-King, 1989). En général (d'après les CSEO indiquées par Norberg-King, 1989[a]), on peut s'attendre à ce que l'essai de sept jours permette d'estimer avec une bonne exactitude la toxicité durant une exposition de 30 jours aux premiers stades du cycle biologique de la tête-de-boule; toutefois, dans certains cas, il peut exister un écart de deux fois, et on peut parfois constater des sous-estimations de l'ordre de dix fois. Par rapport à une exposition couvrant tout le cycle biologique de la tête-de-boule, l'essai de sept jours peut souvent sous-estimer la toxicité sublétale de deux à trois fois, mais l'écart peut parfois aller jusqu'à 25 fois ou plus. L'essai sur les larves décrit dans le présent rapport ne remplace pas nécessairement les essais de toxicité chronique, mais, sur le plan des résultats, il se rapproche plus de ces essais que d'un essai de létalité classique sur de jeunes poissons (p. ex., Environnement Canada, 1990a).

Les résultats de l'essai de sept jours sur les larves ont montré une excellente corrélation avec les évaluations écologiques des eaux polluées. Dans une rivière du Kentucky, on a mis en évidence des coefficients de corrélation de 0,92 à 0,96 entre le taux de mortalité des larves de tête-de-boule et le nombre d'espèces de poissons résidant dans des sections du cours d'eau ainsi que le nombre d'espèces d'invertébrés et leur diversité (Birge *et al.*, 1989). McKim (1985) justifie l'utilisation, pour les essais, de sujets aux premiers stades du cycle biologique et décrit ces stades.

La précision de l'essai de sept jours sur des larves de tête-de-boule a été jugée satisfaisante dans les comparaisons effectuées; par exemple, on a trouvé une correspondance satisfaisante dans une comparaison approfondie de dix laboratoires américains (API, 1988), avec des coefficients de variation interlaboratoire de 13 % pour la survie des larves et de 52 % pour leur poids final. On a calculé un coefficient de variation de 31 % pour les résultats produits par neuf laboratoires de la région de San Francisco (Anderson et Norberg-King, 1991). Cette précision est supérieure à celle des analyses chimiques des polluants prioritaires, pour lesquelles on a obtenu un coefficient moyen de variation interlaboratoire d'au moins 60 % (Rue *et al.*, 1988).

---

a Norberg-King a exécuté de nombreux essais de cinq à sept jours sur des larves de tête-de-boule ainsi que certains essais de 30 à 32 jours sur des poissons aux premiers stades du cycle biologique (en commençant avec des oeufs). Les résultats de ces essais ont été comparés entre eux ainsi qu'avec les conclusions, extraites de la documentation disponible, de cinq essais portant sur des expositions de têtes-de-boule à certains des mêmes produits chimiques. Les résultats sont aussi examinés dans les articles de Suter (1990) et Norberg-King (1990). Lorsqu'on a comparé des essais de cinq à sept jours (24 essais avec quatre produits chimiques) à des essais d'environ 30 jours, ces derniers ont révélé une toxicité plus élevée. Les rapports moyens entre les CSEO des essais de cinq à sept jours et celles des essais de 30 jours étaient les suivants : carbaryl, 0,88; zinc, 1,3; cadmium, 2,3; diazinon, 8,6. Pour le dursban, on a comparé une CSEO après sept jours à trois valeurs après 30 jours extraites de la documentation, et les essais les plus longs ont révélé une toxicité plus élevée de 1,8 fois en moyenne.

Lorsqu'on a comparé des CSEO après sept jours à des CSEO sur l'ensemble du cycle biologique, ces dernières se sont révélées considérablement plus élevées. Les rapports (CSEO après sept jours divisée par la CSEO sur le cycle biologique) se sont établis en moyenne à 2,2 pour le zinc, 3,0 pour le chrome et le carbaryl, >25 pour le dursban et >45 pour le diazinon. Suter *et al.* (1987) signalent que la fécondité des adultes est généralement l'effet le plus sensible dans un essai sur le cycle biologique, la croissance et la survie des larves étant moins sensibles, à un niveau à peu près égal à celui de la mortalité des adultes.

La tête-de-boule est utilisée dans plusieurs laboratoires canadiens de toxicité aquatique, tant gouvernementaux qu'industriels, pour des essais létaux et sublétaux. Une méthode d'essai normalisée a été décrite en Ontario (Neville, 1989), mais aucune méthode normalisée pour cette espèce n'avait été publiée jusqu'ici par un organisme du gouvernement fédéral canadien.

Aux États-Unis, plusieurs groupes ont décrit des méthodes normalisées d'essais sublétaux. Celle qui fait autorité provient de l'*Environmental Protection Agency* (EPA, 1989); les autres descriptions sont pour l'essentiel des adaptations ou des versions abrégées de la méthode fondamentale de l'EPA américaine (p. ex., Battelle, 1987; NJ, 1989).

L'objet du présent document est de définir une méthodologie canadienne «normalisée» d'évaluation de la toxicité sublétale de différentes substances chez des larves de tête-de-boule. Dans les méthodes d'essai que décrivent les documents américains, on rencontre certaines variations concernant les résultats, des questions telles que l'ajustement du pH, les méthodes à suivre compte tenu des divers objectifs poursuivis, les critères applicables à l'eau de contrôle/de dilution et la manière de traiter les échantillons qui contiennent des solides ou des matières en suspension en quantité appréciable. Le présent rapport est destiné à l'évaluation de la toxicité sublétale de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats ou de milieux récepteurs, et on y justifie le choix de certaines façons de procéder.

Cette méthode fait appel à de l'eau douce comme eau de contrôle/de dilution; elle est conçue pour des sujets acclimatés à l'eau douce et porte sur des effluents, des lixiviats ou des élutriats essentiellement constitués d'eau douce (c.-à-d. d'une salinité maximale de 10 g/kg) ou constitués d'eau salée mais destinés à être rejetés dans des eaux douces. On peut l'utiliser dans d'autres contextes, mais elle convient particulièrement lorsqu'il s'agit d'évaluer l'incidence réelle ou potentielle de substances sur des milieux d'eau douce. D'autres essais, portant sur d'autres espèces acclimatées à l'eau de mer, peuvent permettre de déterminer l'incidence réelle ou potentielle de substances dans des milieux estuariens ou marins, ou encore d'évaluer des eaux usées d'une salinité supérieure à 10 g/kg qui doivent être rejetées dans de tels milieux.

Section 2

Organismes soumis à l'essai

2.1 Espèce et stade du cycle biologique

L'espèce servant aux essais est la tête-de-boule (*Pimephales promelas*). On doit utiliser pour les essais des larves écloses depuis 24 h au maximum[b].

2.2 Source

La population destinée à la reproduction doit préférablement être acquise auprès d'un autre laboratoire possédant des poissons exempts de toute maladie (*cf.* 2.3.11). Le transfert d'embryons est la méthode qui pose le moins de risques de transmission de maladies et qui offre également la plus grande facilité sur le plan du transport. On peut aussi, ce qui est moins souhaitable, se procurer des poissons à l'état sauvage, mais il est alors nécessaire de procéder à un examen attentif afin de distinguer l'espèce recherchée des espèces similaires (Scott et Crossman, 1973). La présence de parasites et de maladies est probable chez les poissons sauvages; il faudrait donc les examiner attentivement, les élever en petits groupes isolés et attendre un cycle de reproduction complet avant de pouvoir utiliser la génération suivante pour des essais (Brauhn *et al.*, 1975; Denny, 1987).

L'obtention, l'expédition et le transfert des poissons devraient être approuvés, au besoin, par les autorités provinciales ou régionales. Les gouvernements provinciaux peuvent

---

b On utilise pour les essais des larves écloses depuis au plus 24 h parce qu'on considère les très jeunes poissons comme particulièrement sensibles, même s'il ne semble pas exister de preuves de cela dans la documentation disponible. Les résultats inédits d'essais menés au laboratoire de l'EPA à Duluth auraient indiqué que la sensibilité de larves plus âgées peut être réduite. Des poissons de un, quatre et sept jours étaient sensibles de la même façon aux métaux, mais ceux d'un jour l'étaient davantage aux insecticides au carbamate et aux autres produits toxiques organiques (T.J. Norberg-King, EPA, communication personnelle).

Il y aurait un avantage à l'utilisation de larves plus âgées. En effet, certaines larves (peut-être 6 % de toutes les larves, d'après API, 1988) ne commencent pas à s'alimenter avant 24 h après leur éclosion; certaines d'entre elles pourraient ne jamais commencer à s'alimenter, mourir dans les sept jours et, ainsi, influencer les résultats de l'essai ou, du moins, accroître la variation des données obtenues. Or, après 48 h, on peut distinguer les larves qui se nourrissent à la couleur orange des artémias dans leur tube digestif et on peut éliminer celles qui ne se nourrissent pas, ce qui augmente la précision de l'essai. À l'heure actuelle, il ne semble pas qu'il existe de données quantitatives permettant de comparer objectivement l'importance relative de l'élimination des larves qui ne s'alimentent pas et d'établir la sensibilité plus élevée des larves plus jeunes.

Dans la présente méthode, on exige des larves d'au plus 24 h afin d'utiliser les organismes les plus sensibles et d'accroître la pertinence et l'utilité des données des essais menés ailleurs qui, apparemment, adopteront tous la limite d'âge de 24 h. Dans sa méthode, l'EPA continuera à employer des larves écloses depuis au plus un jour (T.J. Norberg-King, communication personnelle) : en pratique, cela signifie que tous les organismes américains suivront cette règle. La seule exception prévue dans la méthode de l'EPA est qu'on peut utiliser des larves pouvant atteindre 48 h s'il faut les expédier jusqu'à un site éloigné pour les essais (EPA, 1989), mais cela semble peu probable. Il est clair que de grandes quantités de données d'essai seront produites aux États-Unis au moyen de larves de 24 h ou moins, et on pourra les utiliser immédiatement pour établir des prédictions au Canada si la méthode canadienne est comparable. Dans la méthode qu'il utilise, le ministère de l'Environnement de l'Ontario emploie des larves écloses depuis au plus 24 h (Neville, 1989).

exiger un permis pour l'importation de poissons ou de leurs oeufs, que l'espèce soit ou non indigène dans la région visée; en outre, les mouvements de stocks de poissons peuvent être régis par un comité fédéral-provincial des transplantations et des introductions d'espèces. Pour obtenir des conseils sur les sources de poissons et sur la manière d'entrer en contact avec le comité compétent ou avec les autorités provinciales, on peut communiquer avec les bureaux régionaux de la Protection de l'environnement (*cf.* annexe B). Dans les régions où la tête-de-boule n'est pas indigène (C.-B., I.-P.-É., N.-É., T.-N. et certaines parties des autres provinces et territoires (*cf.* 1.2)), il faut faire une demande de permis auprès du comité mentionné ci-dessus, de l'organisme provincial compétent ou du directeur général régional du ministère des Pêches et Océans, selon la marche à suivre en vigueur localement.

2.3 Élevage

2.3.1 Généralités

Les conditions recommandées pour la détention et l'élevage de la tête-de-boule, résumées au tableau 1, sont conçues pour permettre une certaine souplesse au sein d'un laboratoire tout en normalisant les éléments qui, s'ils n'étaient pas contrôlés, pourraient altérer la santé des poissons ou la viabilité de leur progéniture. La majeure partie de la sous-section 2.3 qui concerne particulièrement la tête-de-boule est extraite des rapports de Denny (1987) et de Norberg-King et Denny (1989), que l'on devrait consulter pour obtenir des explications plus détaillées.

Un vidéo de formation préparé par l'EPA des États-Unis (1988) montre les méthodes utilisées à l'*Environmental Research Laboratory* de Duluth (MN) pour l'élevage de la tête-de-boule. Ce vidéo est disponible au Canada grâce à la collaboration de T. Norberg-King (EPA, Duluth); pour l'obtenir, on peut s'adresser à un bureau régional d'Environnement Canada (*cf.* annexe B).

De petits groupes de têtes-de-boule mâles et femelles sont détenus dans des aquariums pourvus de substrats de frai. Les substrats sont inspectés quotidiennement; ceux sur lesquels se trouvent des embryons sont transférés dans des réservoirs d'éclosion et on installe de nouveaux substrats. Les prélèvements opérés dans les réservoirs d'éclosion permettent d'obtenir des larves écloses depuis 24 h ou moins qui seront utilisées dans les essais. Certains poissons sont élevés pour servir à produire les nouvelles générations de poissons adultes. Deux douzaines de paires d'adultes reproducteurs devraient fournir en moyenne au moins 200 embryons par jour, de façon continue, si les poissons improductifs sont périodiquement remplacés par des poissons atteignant l'âge adulte, et 500 embryons ou plus par jour dans de bonnes conditions.

Toutes les larves utilisées dans un essai doivent provenir du même élevage et leur âge doit être connu. Elles devraient être issues d'au moins trois frais (c.-à-d. de différentes lignées), mais il ne s'agit pas là d'une exigence absolue. On recommande fortement de procéder à l'élevage de la tête-de-boule dans le laboratoire qui effectue les essais de toxicité. Cependant, les embryons ou les larves peuvent provenir au besoin d'un autre endroit, à la condition que toutes les caractéristiques requises de l'eau soient maintenues durant le transfert.

2.3.2 Installations

L'éclosion et l'élevage des embryons et des larves peuvent se faire dans des réservoirs fabriqués de matériaux non toxiques comme

Tableau 1 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour l'élevage de la tête-de-boule

Source de poissons	Stock exempt de maladies provenant d'un autre laboratoire. Poissons capturés à l'état sauvage si l'on veille à identifier l'espèce et à éliminer les maladies.
Eau	Eau souterraine ou de surface non contaminée ou, si nécessaire, eau municipale déchlorée. Débit dans les aquariums d'élevage : 1,4 L par gramme de poisson par jour.
Température	Température de détention variant de 4 à 26 °C. Élevage à 25 °C (de 23 à 26 °C), cette température étant obtenue à raison d'au plus 3 °C/d et maintenue entre 23 et 26 °C pendant au moins deux semaines.
Oxygénation/ aération	Oxygène dissous de 80 à 100 % de saturation, maintenu au besoin par aération avec de l'air filtré et exempt d'huile.
pH	Entre 6,8 et 8,5, de préférence entre 7,0 et 8,5.
Qualité de l'eau	La température, l'oxygène dissous, le pH et le débit doivent être surveillés dans chaque réservoir de détention ou d'élevage, de préférence chaque jour.
Éclairage	Éclairement maximal de 500 lux à la surface de l'eau; lumière pendant 16 ± 1 h et obscurité pendant 8 ± 1 h, avec transition progressive de préférence; on recommande un éclairage fluorescent à spectre continu.
Alimentation	Au moins une fois par jour, avec des artémias congelées et un supplément d'aliments commerciaux en boulettes ou en flocons. Le débit d'alimentation est jugé par la quantité consommée en dix minutes. Les conditions de stockage de la nourriture doivent être conformes aux recommandations du fabricant.
Nettoyage	Siphonnage des débris tous les jours ou au besoin.
Maladie	On doit surveiller la mortalité chaque jour et enlever les poissons morts ou moribonds. La mortalité doit être d'au plus 5 % durant les sept jours précédant le prélèvement des embryons. On doit prendre des mesures spéciales si la mortalité atteint 10 % ou plus par semaine chez les poissons jeunes et adultes. Les groupes de poissons malades devraient être éliminés; s'il faut les conserver et les traiter au moyen de produits chimiques, attendre au moins quatre semaines avant de prélever des oeufs pour les essais de toxicité.

le verre, l'acier inoxydable, la porcelaine, le polyester armé de fibre de verre, les plastiques à base d'hydrocarbures perfluorés (Teflon[MC]), l'acrylique, le polyéthylène ou le polypropylène.

L'élevage des têtes-de-boule jeunes et adultes peut se faire dans des aquariums, des bassins ou des réservoirs à écoulement d'eau, lesquels doivent également être fabriqués de matériaux non toxiques tels que ceux mentionnés ci-dessus. On utilise en général des aquariums d'une contenance d'au moins 40 L équipés d'un drain à tube vertical. Les poissons devraient être élevés à l'abri de toute perturbation physique et, de préférence, dans un endroit distinct de celui où se trouvent les récipients d'essai. Les aquariums pour l'élevage sont en général situés à l'intérieur mais peuvent également être à l'extérieur; les aquariums destinés à l'obtention des embryons et des jeunes devraient se trouver dans le laboratoire, exposés aux conditions d'essai normalisées concernant notamment l'éclairage, la température et l'eau.

Les aquariums de reproduction sont divisés ou partiellement divisés, pour les fins du frai, par des écrans en acier inoxydable ou des feuilles de plastique rigide, opaque ou transparent. Un substrat de frai, destiné à servir de territoire à un poisson mâle, est placé dans chacun des compartiments ainsi créés. La configuration exacte peut varier et n'est pas d'une importance cruciale. Un aquarium de 40 L pourrait posséder deux compartiments comportant chacun un substrat de frai avec une cloison percée d'une «porte» permettant les allées et venues des poissons (surtout des femelles). On pourrait également diviser l'aquarium en quatre compartiments destinés à recevoir quatre substrats, avec un mâle et une femelle dans chaque compartiment (Denny, 1987).

Le substrat de frai est constitué par la moitié d'un cylindre de tuile ou de tuyau. Le matériau n'est pas critique et peut être du plastique PCV ou un matériau poreux comme l'argile ou le béton (Benoit et Carlson, 1977). La tuile, d'un diamètre d'environ 10 cm, est coupée en sections de 7 à 10 cm, puis est coupée en deux dans le sens de la longueur. Une moitié inversée est placée dans chaque compartiment destiné à un mâle.

Des bassines en plastique blanc constituent des «plateaux d'éclosion» pratiques si l'éclosion des embryons se fait sur les tuiles. On peut en placer jusqu'à six en immersion partielle dans un grand bain-marie. Si celui-ci est situé sous les aquariums de reproduction, on peut y amener l'eau usée de ces aquariums pour en assurer le chauffage. On peut aussi retirer les oeufs des tuiles et les faire éclore dans une ampoule à décantation (*cf.* 2.3.8).

2.3.3 Éclairage

L'éclairage durant l'élevage et la reproduction peut être naturel ou assuré par des appareils suspendus, de préférence des lampes fluorescentes à spectre continu[c]. La photopériode devrait normalement correspondre à une séquence constante de 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité. Un éclairement de 500 lux à la surface est adéquat pour l'élevage des poissons. Une

---

c Il est recommandé, mais non obligatoire, d'utiliser pour l'éclairage artificiel des lampes fluorescentes à spectre continu (p. ex., Vitalite[MC], Benelux 55[MC]), afin de simuler les caractéristiques de l'éclairage naturel (Denny, 1987). Divers laboratoires indiquent qu'ils ont réussi à élever des têtes-de-boule avec des lampes moins coûteuses, de type «blanc froid» ou «blanc chaud».

période de transition de 15 à 30 minutes est recommandée pour l'éclairage artificiel[d].

2.3.4 Eau

Pour la détention et l'élevage des poissons, on peut utiliser de l'eau souterraine ou de surface non contaminée ou, si nécessaire, de l'eau potable municipale déchlorée (*cf.* paragraphe suivant). On devrait au préalable avoir démontré que cette eau favorise de façon constante et fiable la survie, la santé et la croissance de la tête-de-boule. Pour assurer la qualité de l'eau, il faudrait effectuer, aussi souvent que nécessaire, des contrôles et des évaluations de variables telles que le chlore résiduel total (si l'on utilise de l'eau municipale), le pH, la dureté, l'alcalinité, le carbone organique total, la conductivité, les solides en suspension, l'oxygène dissous, les gaz totaux dissous, la température, l'azote ammoniacal, les nitrites, les métaux et les pesticides.

L'eau déchlorée n'est pas recommandée pour l'élevage des poissons, en particulier pour l'éclosion des embryons et pour l'élevage des larves. Il est difficile d'éliminer les dernières traces de chlore résiduel et de substances organochlorées, qui pourraient être toxiques pour les larves de tête-de-boule. S'il faut utiliser de l'eau potable municipale pour l'élevage des poissons et comme eau de contrôle/de dilution, on doit la soumettre à une déchloration efficace pour en extraire toute concentration nocive de chlore. On peut procéder à une aération vigoureuse de l'eau pour éliminer une partie du chlore gazeux volatil. On pourrait ensuite utiliser des filtres au charbon actif (noir d'os) puis un rayonnement ultraviolet (Armstrong et Scott, 1974) pour enlever la plus grande partie de la chloramine résiduelle et des autres composés organochlorés. Il pourrait aussi être avantageux de laisser reposer l'eau dans des bassins de détention aérés. La teneur maximale en chlore résiduel total recommandée pour la protection des organismes d'eau douce est de 0,002 mg/L (CCMRE, 1987); toute valeur supérieure risque d'engendrer une interaction entre la toxicité du chlore et celle de la substance à expérimenter[e]. Outre les mesures de la teneur en chlore, la surveillance de la production d'oeufs et de la survie des poissons peut fournir la preuve de la qualité satisfaisante de l'eau.

Si l'on utilise de l'eau de surface pour l'élevage des poissons, on devrait la filtrer

---

d Une période de transition est recommandée, étant donné que des changements brusques d'intensité ont pour effet d'effrayer et de stresser les poissons. Il existe des systèmes de rhéostats automatisés pour diminuer et accentuer l'intensité de l'éclairage fluorescent; ces systèmes sont cependant coûteux. On peut également utiliser une source secondaire d'éclairage à incandescence, réglée par minuterie et rhéostat automatisé, afin d'assurer cette période de transition.

e Le chlore est très toxique pour les organismes aquatiques, particulièrement les crustacés et les poissons aux premiers stades de leur cycle biologique. Par exemple, une concentration de 0,011 mg/L de chlore résiduel total cause des effets chroniques sublétaux chez la tête-de-boule, et des concentrations un peu plus élevées (de 0,040 à 0,045 mg/L) pourraient avoir un effet létal aigu chez la truite arc-en-ciel et chez une espèce de méné (Arthur et Eaton, 1971; Wolf *et al.*, 1975; Ward et DeGraeve, 1978, CCMRE, 1987). Une exposition à 0,08 mg/L de chlore résiduel total pour seulement 2 h/d pourrait se révéler létale chez de jeunes têtes-de-boule (Wilde *et al.*, 1983), ce qui fait qu'on pourrait s'attendre à des effets sublétaux à des concentrations au moins dix fois inférieures. La limite recommandée de 0,002 mg/L, extraite des lignes directrices canadiennes (CCMRE, 1987), est conforme aux recommandations en vigueur aux États-Unis. Brungs (1973) a recommandé un maximum de 0,002 mg/L pour la protection de la plupart des formes de vie aquatique dans les milieux récepteurs, et la NAS/NAE (1974) a recommandé un maximum de 0,003 mg/L, en tout temps et en tout lieu, pour la protection de la vie en eau douce.

afin d'éliminer les prédateurs ou les compétiteurs potentiels de la tête-de-boule. Un filtre à sable ordinaire ou un filtre sur canalisation commercial conviendrait à cet effet. Les petites quantités peuvent être filtrées sur un filet à mailles serrées (moins de 60 µm). La stérilisation aux ultraviolets est recommandée pour réduire le risque d'introduction d'agents pathogènes dans la colonie de poissons.

S'il faut utiliser de l'eau reconstituée comme eau de contrôle/de dilution (*cf.* 5.3), les poissons adultes doivent être acclimatés à cette eau ou à une eau semblable pendant au moins cinq jours immédiatement avant l'obtention des embryons destinés à l'essai[f]. L'eau semblable pourrait être : *a*) une eau naturelle dont la dureté correspond à 20 % près à celle de l'eau reconstituée; *b*) une eau naturelle plus dure, ajustée au moyen d'eau désionisée pour obtenir la dureté souhaitée; ou *c*) une eau naturelle plus douce ajustée avec une quantité et une proportion appropriées de sels de qualité «réactif» (p.ex., ASTM, 1980; Environnement Canada, 1990b, tableau 2).

L'eau dans les aquariums contenant les poissons adultes devrait être renouvelée dans le but d'empêcher l'accumulation des déchets métaboliques. On devrait admettre au moins 1 mL/min d'eau fraîche dans l'aquarium par gramme de poissons détenus (soit 1,4 L/g · d^{-1} ou 0,69 g · d/L)[g]. Pour un aquarium contenant 50 g de poisson, cela correspondrait à un apport de 70 L/d ou de 50 mL/min. Des circonstances exceptionnelles, par exemple, l'acclimatation des poissons à de l'eau reconstituée, peuvent nécessiter le filtrage et la recirculation de l'eau, ou encore son renouvellement périodique dans les systèmes statiques. Un système d'élevage à recirculation est décrit par Rottmann et Campton (1989). En cas de réutilisation de l'eau, il faudrait doser fréquemment l'ammoniac et les nitrites afin de s'assurer qu'ils n'atteignent pas des niveaux nocifs. Les objectifs établis pour la protection de la vie en eau douce sont des concentrations maximales de 0,02 mg/L pour l'ammoniac non ionisé (Ontario, 1984) et de 0,06 mg/L pour les nitrites (CCMRE, 1987).

L'eau qui entre dans les aquariums ne doit pas être sursaturée en gaz. Si on a lieu de croire qu'il peut y avoir sursaturation, on devrait vérifier fréquemment la pression de gaz totale de l'alimentation en eau (Bouck, 1982). On doit recourir à des mesures correctives (p. ex., l'utilisation de colonnes d'aération ou une aération vigoureuse dans un réservoir ouvert) si la teneur en gaz dissous dépasse 100 % de la valeur de saturation. Il n'est pas simple d'éliminer complètement la sursaturation; si l'on sait ou si l'on soupçonne que ce problème existe, il faudrait effectuer fréquemment des vérifications.

La température de l'eau, l'oxygène dissous, le pH et le débit devraient être surveillés dans chaque aquarium ou récipient, de préférence chaque jour. Il est recommandé

---

f Sans cette acclimatation, on peut perdre l'avantage que présente une eau de dilution normalisée. Ainsi, il faut compter plusieurs jours pour permettre aux poissons de réadapter leur tolérance aux métaux lourds quand ils sont placés dans une eau à teneur minérale différente (Lloyd, 1965).

g Au besoin (p. ex., si les poissons sont acclimatés à de l'eau reconstituée, à un milieu récepteur ou à une eau d'une autre source dont la quantité est restreinte), on peut réduire considérablement les besoins en eau pour l'acclimatation en faisant recirculer l'eau dans l'aquarium après l'avoir fait passer par un filtre adapté à l'élimination des déchets métaboliques (p. ex., Rottmann et Campton, 1989). Si l'on procède ainsi, il faudrait surveiller les concentrations d'ammoniac et de nitrites dans l'eau et les maintenir en deçà des niveaux nocifs pour les poissons.

de vérifier une fois par semaine, ou plus fréquemment, les teneurs en ammoniac, en nitrites et en chlore résiduel total (si l'on utilise de l'eau municipale).

2.3.5 *Température*

On peut détenir des lots de poissons en vue d'essais ultérieurs à des températures aussi basses que 4 °C. On devrait éviter les températures élevées : la valeur optimale pour cette espèce est de 23,5 °C, et 32 °C constitue une limite à partir de laquelle on observe des troubles de la reproduction et l'apparition d'effets sur la croissance (Brungs, 1971b). Lors de la préparation d'un lot de poissons pour la reproduction, on peut modifier la température de l'eau à raison d'au plus 3 °C/d jusqu'à ce que l'on atteigne environ 25 °C. Les poissons devraient être maintenus à une température située entre 22 et 26 °C pendant au moins deux semaines et, de préférence, pendant trois semaines ou plus avant que l'on puisse utiliser leurs embryons pour obtenir les larves destinées aux essais de toxicité. On sait que des températures à l'extérieur de l'intervalle de 22 à 26 °C ont pour effet de diminuer la production d'oeufs (Brungs, 1971b).

2.3.6 *Oxygène dissous*

L'eau des aquariums de détention et d'élevage devrait avoir une teneur en oxygène dissous correspondant à 80 à 100 % de saturation en air. On devrait la soumettre à une aération modérée au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile. Ce type d'aération, au moyen de pierres de barbotage commerciales, est d'usage courant et contribue à mélanger l'eau et à maintenir des conditions physico-chimiques uniformes. On doit éviter toute aération vigoureuse, surtout en présence de larves ou de jeunes poissons.

2.3.7 *pH*

Le pH de l'eau utilisée pour la détention et l'élevage des poissons devrait se situer entre 6,8 et 8,5 et, de préférence[h], entre 7,0 et 8,5.

2.3.8 *Croissance et reproduction des poissons*

Les poissons post-larvaires, jeunes et ayant atteint la maturité sont normalement élevés dans des aquariums. Il faudrait réduire graduellement le nombre de poissons par aquarium au fur et à mesure de leur croissance, en transférant des poissons dans d'autres aquariums. Lorsque les poissons

---

h L'objectif de la détention et de l'élevage est d'obtenir des conditions qui sont plutôt favorables aux poissons. Or, la tête-de-boule n'est pas bien adaptée aux pH acides. On a observé des effets négligeables jusqu'à un pH de 6,6, d'où la valeur minimale de 6,8 recommandée pour l'élevage des poissons. Le maintien du pH à une valeur d'au moins 7,0 semble offrir une marge de manoeuvre plus réaliste afin d'éviter tout effet sublétal au cours de l'élevage. Ce pH est donc indiqué comme préférable, même si la rareté des données sur les effets des pH variant entre 6 et 7 n'offre guère de justification directe de cette valeur.

Un pH de 6,0 est tout à fait inacceptable pour la reproduction de la tête-de-boule et semble inacceptable pour son élevage. En eau douce et en laboratoire, McCormick *et al.* (1989) ont observé une réduction appréciable de la survie des poissons, depuis le stade de l'oeuf jusqu'à quatre jours après l'éclosion, si le pH était de 6,0 plutôt que de 7,5. À des pH de 7,5, 6 et 5,5, les taux de survie étaient respectivement de 92, 60 et 0 %, la présence d'aluminium à l'état de traces ne devant pas avoir eu d'effet sur ces résultats. Dans une longue expérience menée dans un ruisseau artificiel aménagé à l'extérieur (ce qui est l'un des types les plus significatifs d'essais de toxicité), Zischke *et al.* (1983) ont observé qu'à des pH de 8 (contrôle), 6 et 5, les nombres estimatifs d'oeufs produits par des populations parallèles de têtes-de-boule étaient respectivement de 41 000, 33 100 et 110, tandis qu'au terme de l'expérience, les nombres de jeunes survivants s'établissaient respectivement à 2 924, 14 et 1. Ces auteurs ont conclu qu'une poursuite de l'acidification aurait probablement causé l'extinction des populations de tête-de-boule à des pH de 5 et 6, et que leurs résultats appuyaient les recommandations relatives au pH minimal (6,5) formulées par la *National Academy of Sciences* et par l'EPA (NAS/NAE, 1974; EPA, 1976).

approchent de la taille adulte, on peut prélever des mâles et des femelles pour peupler les aquariums de reproduction. Les sexes ne peuvent être distingués que lorsque les poissons atteignent l'âge de se reproduire, ce qui a lieu d'ordinaire entre 16 et 24 semaines (*cf.* figure 2). Les femelles conservent l'aspect du méné d'argent mais un ovipositeur apparaît en avant de leur nageoire anale. Les mâles sont de plus grande taille; des zones noires apparaissent sur leurs flancs avec deux barres verticales claires près de l'avant du corps, et il leur pousse un bourrelet avec des tubercules sur la partie arrière de la tête et des tubercules sur le front ou museau. Lorsque les poissons sont parvenus à maturité, il faudrait placer dans les aquariums d'élevage deux ou trois substrats de frai. Certains mâles se les approprieront, restant la plupart du temps à l'abri (c.-à-d. sous la tuile ou tout autre substrat de frai) et tenant les autres poissons à distance, sauf pour frayer.

Lorsque les poissons montrent des signes de maturité, on peut sélectionner des mâles et des femelles dans les réservoirs d'élevage et les utiliser pour peupler les aquariums de reproduction. Avec le temps, d'autres mâles prendront possession de substrats et d'autres femelles se développeront, et on pourra ainsi peupler d'autres aquariums de reproduction. Si un aquarium de reproduction est divisé en deux compartiments, il pourrait être peuplé avec deux mâles et de quatre à six femelles. Par ailleurs, on pourrait placer un mâle et une femelle dans chacun de quatre compartiments créés dans un aquarium; selon Denny (1987), la méthode des paires augmente la production totale d'oeufs et permet de la mesurer facilement et, partant, de remplacer les poissons improductifs. Les poissons devraient être remplacés par d'autres s'ils ne produisent pas d'oeufs pendant une période de trois semaines. On pourrait procéder au remplacement automatique des poissons après une période déterminée de trois ou de six mois.

Les oeufs seront déposés à l'intérieur du substrat de tuile, sur son «plafond». Il faudrait procéder à une inspection quotidienne au milieu de la matinée, car le frai a souvent lieu tôt le matin. On peut procéder à l'inspection en tâtant l'intérieur de la tuile avec un doigt ou, ce qui est moins souhaitable, en retirant la tuile pour l'inspecter. S'il y a des embryons, on retire la tuile et on la remplace par une tuile propre. La tuile possédant des embryons est transférée dans un plateau d'éclosion. On peut placer deux tuiles bout à bout en cercle, avec une pierre de barbotage à l'intérieur pour entretenir la circulation de l'eau. Pour contribuer à empêcher la propagation d'infections fongiques, il est souhaitable d'aérer individuellement les tuiles dans des bechers immergés dans un plateau d'éclosion (*cf.* 2.3.2).

Un laboratoire canadien a éprouvé de graves difficultés au cours d'essais sur des larves de tête-de-boule à un pH de 6,5, la mortalité étant assez considérable chez les organismes témoins pour qu'il faille reprendre certains essais six fois ou plus (T. Kovacs, Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire (QC), communication personnelle). Mount (1973) a effectué un essai sur l'ensemble du cycle biologique avec de l'eau dure qui devait être favorable à la tête-de-boule (dureté de 200 mg/L), mais les résultats ont indiqué certains effets nocifs sur la reproduction à un pH de 6,6. Pour des expositions à quatre valeurs de pH, il a obtenu les nombres suivants d'oeufs produits par femelle dans deux essais parallèles : pH 7,5 = 480 et 968; pH 6,6 = 210 et 394; pH 5,9 = 66 et 101; pH 5,2 = 0 et 0. Avec les mêmes valeurs, les nombres de frais par femelle s'établissaient comme suit : 4,2 et 5,4, 3,0 et 4,0, 1,0 et 1,2, 0 et 0. Il est impossible de soumettre les résultats de Mount à une analyse statistique sans avoir accès aux données brutes, mais la réduction d'environ 42 % du nombre moyen d'oeufs à un pH de 6,6, par rapport au nombre observé à un pH de 7,5, a toutes les apparences d'un effet nocif.

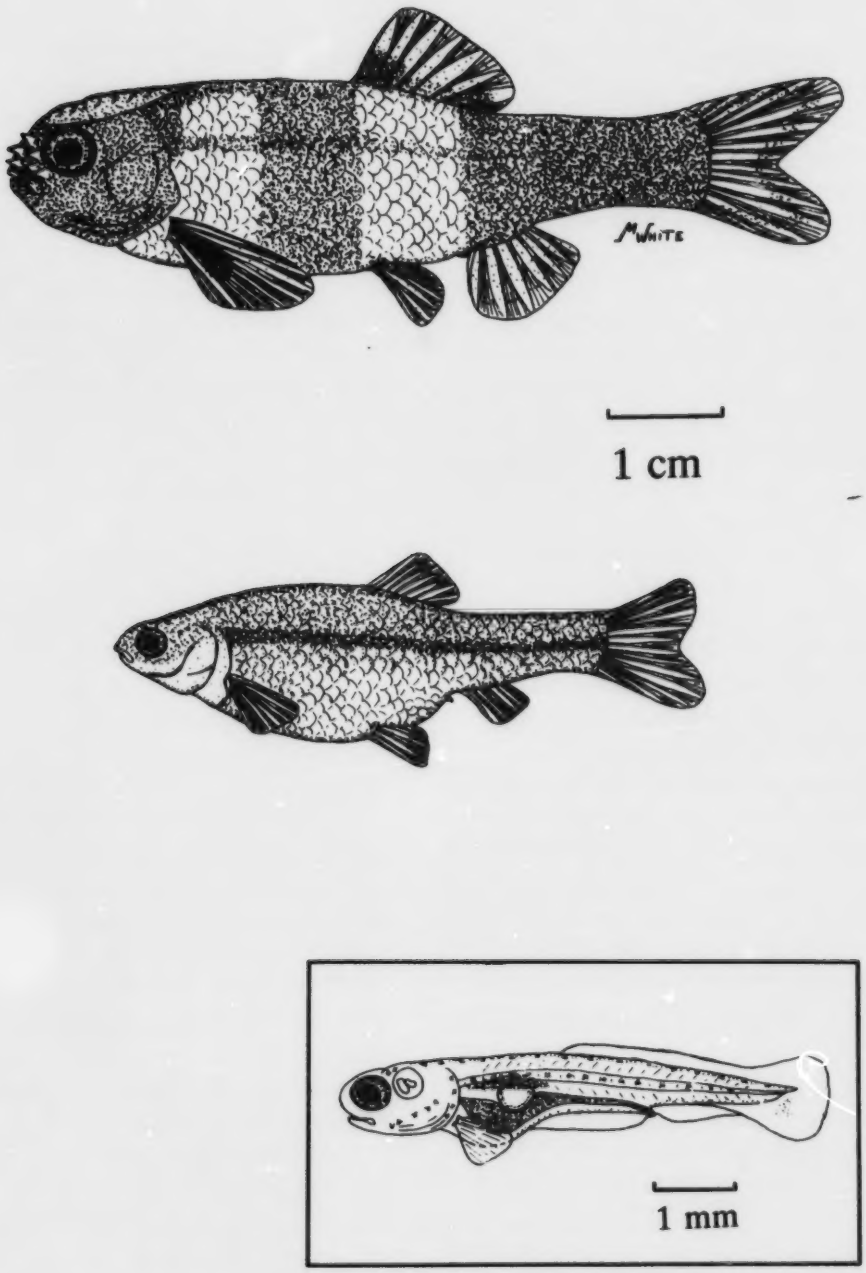


Figure 2 **Aspect général de têtes-de-boule mâle et femelle ayant atteint la maturité sexuelle et d'une larve environ quatre jours après l'éclosion**
(Dessins originaux de M.A. White, d'après des spécimens)

Des mâles n'ayant pas atteint la maturité sexuelle ne posséderaient pas de tubercules sur le museau, de bourrelet rugueux sur le sommet de la tête ni de bandes verticales de couleur. Des femelles n'ayant pas atteint la maturité sexuelle ne posséderaient pas d'ovipositeur en avant de la nageoire anale et n'auraient pas le ventre déformé par les oeufs.

Les embryons en incubation doivent être inspectés quotidiennement. Les embryons morts et ceux infectés par des champignons doivent être retirés et jetés; les embryons morts sont opaques ou possèdent une tache blanche à l'intérieur. Les tuiles où la croissance de champignons est importante devraient être éliminées. Les perturbations devraient être minimales du troisième au cinquième jour, car elles peuvent causer une éclosion prématurée. Les embryons éclosent en quatre ou cinq jours selon la température, qui devrait être maintenue entre 22 et 25 °C. Les larves sont ensuite retirées à l'aide d'une pipette de grand calibre munie d'une poire en caoutchouc et sont utilisées pour les essais. Les tuiles de frai utilisées sont désinfectées (*cf.* 2.3.10); on les laisse tremper dans de l'eau et on les rince à fond avant des les réutiliser. Pour élever des poissons jusqu'à l'âge adulte afin de former un nouveau stock de reproducteurs, on place des lots de 200 à 300 larves dans des aquariums avec 20 cm d'eau. Dans ces lots de poissons, il faudrait estimer approximativement le taux de succès des éclosions ainsi que la mortalité chez les larves durant les 30 premiers jours de leur vie.

Une autre technique d'élevage consiste à faire doucement rouler les oeufs d'une tuile de frai lisse (en PCV) à l'aide d'un doigt mouillé. On place les oeufs dans une ampoule à décantation sous aération afin de les maintenir en suspension dans l'eau. Les oeufs morts ou infectés par des champignons sont retirés et jetés après 24 et 48 h. Après 48 h, les oeufs viables sont transférés dans de petits récipients ou aquariums et sont vigoureusement aérés jusqu'à l'éclosion.

En cas d'élevage prolongé de la tête-de-boule dans un laboratoire, il faudrait prendre des mesures pour éviter la sélection d'une souche homogène. On devrait choisir les larves destinées à la reproduction dans des lignées différentes à intervalles réguliers, au lieu de conserver un grand nombre de larves provenant d'un seul frai ou de quelques-uns seulement. Tous les deux ans, le pool génique devrait être enrichi par des échanges avec un autre laboratoire; toutefois, il serait préférable d'introduire quelques poissons sauvages. Les nouveaux poissons devraient être examinés attentivement par un expert en taxinomie. Il faudrait rejeter tout poisson porteur d'une maladie et traiter tous les autres pour cette maladie (*cf.* 2.3.10 et 2.3.11; Denny, 1987); on devrait ensuite les isoler en petits groupes jusqu'à leur reproduction, de sorte que ce soit bien leur progéniture qui soit ajoutée au stock du laboratoire. Il est encourageant de constater que, lors d'une étude comparative entre dix laboratoires, la source des poissons ne semblait pas avoir d'influence sur les résultats (API, 1988).

2.3.9 Alimentation

Il est recommandé de nourrir les têtes-de-boule jeunes et adultes avec des artémias congelées et un supplément de nourriture commerciale pour poissons. Des aliments commerciaux en «paillettes» peuvent constituer une partie de l'alimentation, mais seulement à titre de supplément des artémias. Des aliments commerciaux en boulettes de taille assez petite peuvent également être utilisés, toujours à titre de supplément. Selon la température de l'eau et leur taille, les poissons devraient être nourris une ou plusieurs fois par jour, la ration quotidienne correspondant normalement à 1 à 5 % du poids corporel frais. En pratique, la meilleure manière d'estimer la quantité de nourriture requise est d'évaluer la quantité consommée par les poissons en environ dix minutes, la quantité restant au fond du réservoir, et l'aspect et l'état des poissons. La méthode et la durée maximale de

stockage de la nourriture pour poissons devraient être conformes aux recommandations du fabricant.

Les poissons récemment éclos devraient être nourris de nauplius d'artémia (*Artemia salina*) dont l'éclosion date de moins de 24 h (*cf.* annexe C). Les larves de tête-de-boule commencent à se nourrir vers la fin de leur première journée de vie ou peu de temps après; par conséquent, on pourrait commencer à les alimenter lorsqu'elles sont âgées d'environ 12 h. On devrait leur fournir des artémias au moins deux fois par jour, car celles-ci ne vivent que 8 h dans l'eau douce. La première ration devrait être distribuée tôt le matin, de sorte que les larves de tête-de-boule puissent consommer des nauplius vivants tout au long de la journée. Les poissons au premier stade larvaire ne peuvent ingérer que de petits nauplius d'artémia récemment éclos dont la taille ne dépasse pas de 0,24 à 0,28 mm. Lorsque les larves grandissent, elles peuvent être nourries de nauplius de plus grande taille et, après environ 30 jours, elles peuvent être graduellement habituées aux artémias congelées et à d'autres aliments à titre de supplément. La quantité de nourriture à fournir (volume de liquide contenant une certaine concentration de nauplius) dépend dans une certaine mesure de la nature du système d'élevage (*cf.* annexe C).

Il est souhaitable d'évaluer la présence de substances toxiques dans tous les aliments pour poissons, mais en particulier dans les aliments en paillettes et dans les oeufs d'artémia (*cf.* annexe C). Les substances toxiques à surveiller sont les métaux et les pesticides sujets à la bioaccumulation. On peut souvent se baser sur l'expérience des autres laboratoires et sur les mesures qu'ils ont effectuées. Il est souhaitable d'indiquer d'où proviennent les oeufs d'artémia de sorte que l'on puisse déceler, avec le temps, toute association entre la source d'oeufs et les taux de succès de l'élevage et des essais.

2.3.10 Nettoyage des réservoirs

Les réservoirs utilisés pour la détention et l'élevage des poissons devraient rester raisonnablement propres. Une fois par jour ou aussi souvent que nécessaire, il faudrait, en dérangeant le moins possible les poissons, siphonner la nourriture excédentaire et les excréments afin d'éviter qu'ils ne s'accumulent. Les champignons ou les algues bleues en quantité excessive devraient être grattés et enlevés, et il faudrait s'efforcer d'éliminer toute condition propice à leur croissance. Toutefois, on devrait tolérer la présence en petite quantité d'autres algues et d'invertébrés sur les parois des aquariums, car ils peuvent servir de source supplémentaire de nourriture et d'activité pour les poissons.

Afin de diminuer la fréquence des maladies, il faudrait désinfecter les réservoirs avant d'y déposer un nouveau lot de poissons. Les désinfectants appropriés comprennent ceux qui renferment des composés chlorés ou iodophores, ou du chlorure de n-alkyldiméthylbenzylammonium (p. ex., Comet^{MC}, Ovidine^{MC}, Argentyne^{MC} ou Roccal^{MC}). Étant donné que les désinfectants sont toxiques pour les poissons, les réservoirs devraient ensuite être rincés à fond avec l'eau servant à l'élevage des poissons.

2.3.11 Morbidité, mortalité et traitement des poissons

Il faudrait inspecter chaque jour les poissons adultes et préadultes afin de détecter des signes de maladie (Amlacher, 1970; Brown

et Gratzek, 1980; Roberts et Shephard, 1986)[i]. Les sujets morts ou moribonds devraient être enlevés immédiatement. Pendant la période de sept jours précédant le prélèvement des oeufs, la mortalité devrait être inférieure à 5 % de la population totale élevée et à 5 % des poissons présents dans chaque réservoir ou aquarium, ou encore être limitée à un poisson dans le cas des aquariums de reproduction contenant un petit nombre de poissons. Si la mortalité est supérieure à ces valeurs, il faudrait prolonger la détention des poissons d'au moins sept jours avant le prélèvement des oeufs, jusqu'à ce que l'on atteigne un taux de mortalité ne dépassant pas 5 % en sept jours. Si, dans un stock de poissons reproducteurs adultes, le taux de mortalité est supérieur à 10 % par semaine à tout moment[j], ce stock de poissons ne devrait pas être utilisé pour produire des poissons destinés aux essais; il faudrait rechercher intensivement la cause de la mortalité et lancer d'autres élevages à partir de stocks apparemment en bonne santé.

Il faudrait éviter, dans la mesure du possible, de traiter les poissons malades à l'aide de produits chimiques antimaladie. Il est fortement recommandé de se départir plutôt des stocks de poissons qui présentent des signes de maladie. On pourrait procéder ainsi lorsque des lots sont détenus séparément dans plusieurs aquariums ou réservoirs. Si les poissons sont traités, il faudrait attendre au moins quatre semaines avant de prélever leurs oeufs pour des essais.

---

i Les symptômes de problèmes de santé chez les poissons comprennent la perte d'appétit, une distribution anormale dans le réservoir, la léthargie, un comportement de nage irrégulier ou atypique, une coloration foncée, des branchies pâles, des nageoires rongées ou effilochées et des lésions externes. Les ouvrages d'Amlacher (1970) et de Brown et Gratzek (1980) sont des guides utiles pour le dépistage et le diagnostic préliminaires des maladies chez les poissons. La deuxième édition du *Handbook of Trout and Salmon Diseases* (Roberts et Shephard, 1986) est aussi utile à cette fin pour toutes sortes de poissons, en plus des salmonidés.

j Selon les critères de mortalité prescrits par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE, 1984).

Section 3

Système d'essai

3.1 Installations et appareillage

L'essai doit être réalisé dans une installation isolée des allées et venues générales du laboratoire. S'il n'existe pas de pièce isolée, la zone d'essai devrait être entourée d'un rideau opaque (p. ex., en plastique noir) afin de réduire le stress infligé aux poissons pendant l'essai. La poussière et les émanations devraient être réduites au minimum dans les installations d'essai et d'élevage.

Il faut prévoir une installation d'essai permettant de maintenir la température de toutes les solutions d'essai à une moyenne de 25 ± 1 °C, les fluctuations extrêmes étant comprises entre 23 et 27 °C. On peut y arriver par différents moyens, notamment un appareil de conditionnement de l'air réglé par thermostat ou un bain-marie à température contrôlée dans lequel les récipients d'essai sont immergés.

Les matériaux de construction et les appareils pouvant entrer en contact avec l'eau de contrôle/de dilution ou les solutions d'essai ne devraient pas renfermer de substances susceptibles de dénaturer par lixiviation les solutions d'essai ou d'accroître la sorption de la substance à expérimenter (*cf.* 2.3.2). Le laboratoire doit être doté des appareils voulus pour mesurer les variables fondamentales de la qualité de l'eau (température, conductivité, oxygène dissous et pH), et l'on doit être prêt à effectuer une analyse rapide et exacte d'autres variables comme la dureté, l'alcalinité, l'ammoniac et le chlore résiduel.

3.2 Éclairage

Les conditions d'éclairage devraient être identiques à celles définies à la division 2.3.3. La photopériode doit coïncider avec celle à laquelle les poissons ont été acclimatés.

3.3 Récipients d'essai

Les récipients d'essai peuvent être des bechers ou des contenants rectangulaires en verre borosilicaté[k] (comme le Pyrex[MC]), en plastique à base d'hydrocarbures perfluorés (Teflon[MC]) ou en polystyrène jetable. On peut utiliser des contenants non toxiques fabriqués d'autres matières plastiques comme le polypropylène ou le polyéthylène; cependant, on ne devrait généralement pas les réutiliser pour un deuxième essai, car le plastique peut adsorber des substances toxiques qui pourraient être libérées lors d'un essai subséquent.

Le récipient doit contenir au moins 250 mL de solution durant l'essai; un volume de 500 mL est recommandé. On peut utiliser des volumes pouvant atteindre 1 L, qui offriraient une protection additionnelle contre l'appauvrissement de la substance toxique ou de l'oxygène dissous. Tous les récipients d'essai devraient contenir au moins 3 cm d'eau. Le récipient ne devrait

---

k Les contenants en verre sont inertes et faciles à nettoyer, et ils permettent d'observer sans obstacle les poissons. L'adsorption des contenants qui ne sont pas en verre (p. ex., en polyéthylène, en polypropylène, en acier inoxydable) varie considérablement d'un produit chimique à un autre.

pas limiter indûment l'aire de surface de la solution d'essai, car la diffusion de l'oxygène à travers la surface pourrait être un facteur important lors de l'essai d'effluents ou d'autres substances ayant une demande en oxygène. À titre indicatif, le diamètre du récipient devrait être approximativement égal à la profondeur de la solution d'essai. Avec une telle valeur, 500 mL de liquide devraient remplir un contenant d'un diamètre de 8,6 cm à une profondeur de 8,6 cm, ce qui donne une aire de surface d'environ 58 cm^2.

On dispose d'une latitude considérable pour la conception et la forme des récipients d'essai. Ils peuvent être spécialement construits pour faciliter le renouvellement des solutions d'essai sans endommager les poissons. Par exemple, on peut utiliser un réservoir de verre à vidange munie d'un grillage pour éliminer la solution d'essai usée par siphonnage, les larves étant maintenues sans danger de l'autre côté du grillage (Norberg et Mount, 1985). (Cette méthode exige toutefois encore qu'on déloge et qu'on siphonne les débris directement dans la section contenant les larves.) On peut aussi immerger des contenants en plastique dotés d'un fond grillagé ou d'autres types de «cages» grillagées dans un grand récipient contenant la solution d'essai et les soulever facilement pour les transférer dans un autre récipient contenant de la solution fraîche. Un filet de Nytex^{MC} à mailles de 500 µm s'est révélé intéressant, car les artémias mortes peuvent le traverser mais les larves de poisson y sont retenues. Pour un essai donné, la profondeur de l'eau et le type, la taille et la forme du contenant devraient être identiques pour toutes les solutions d'essai. Il faudrait recouvrir les récipients d'une plaque de verre durant l'essai afin d'éviter tout risque de contamination par l'air et toute perte d'éléments volatils.

3.4 Eau de contrôle/de dilution

Selon la substance à expérimenter et l'objet de l'essai (*cf.* sections 5 à 7), l'eau de contrôle/de dilution peut être : de l'eau souterraine ou de surface (provenant d'un cours d'eau ou d'un lac) non contaminée; de l'eau reconstituée ayant une dureté et un pH particuliers (p. ex., semblables à ceux du milieu récepteur); un échantillon de milieu récepteur recueilli en amont ou à proximité de la source de contamination, mais à l'abri de son influence; ou de l'eau municipale déchlorée[1] (*cf.* 2.3.4). Les conditions de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la sous-section 6.1. Si l'on utilise de l'eau de surface, on devrait la filtrer sur un filet à mailles serrées (moins de 60 µm) afin d'éliminer tous les prédateurs et compétiteurs potentiels de la tête-de-boule.

L'eau de contrôle/de dilution doit être amenée à une température de 25 ± 1 °C avant d'être utilisée. Elle ne doit pas être sursaturée en gaz (*cf.* 2.3.4). Avant son utilisation, elle devrait avoir une teneur en oxygène dissous de 90 à 100 % de la valeur de saturation en air. Au besoin, on devrait l'aérer vigoureusement (à l'aide d'un jet d'air comprimé exempt d'huile passant à travers des pierres de barbotage) immédiatement avant l'utilisation, et on devrait confirmer qu'une teneur de 90 à 100 % d'oxygène dissous a bien été atteinte.

---

1 L'addition de thiosulfate ou d'autres produits chimiques à l'eau de dilution pour enlever le chlore résiduel n'est pas recommandée. Ces produits chimiques pourraient modifier la toxicité de l'échantillon.

Section 4

Méthodes universelles

Les méthodes exposées dans la présente section s'appliquent à l'ensemble des essais d'eaux usées et de produits chimiques visés dans les sections 5, 6 et 7. Tous les aspects du système d'essai défini dans la section 3 doivent leur être intégrés. Le tableau 2 donne une liste de contrôle récapitulative des méthodes recommandées pour tous les essais de toxicité et pour ceux portant sur des types de substances particuliers.

4.1 Préparation des solutions d'essai

Tous les récipients, dispositifs de mesure, appareils d'agitation et seaux pour le transfert des poissons doivent être nettoyés et rincés à fond, conformément aux modes opératoires normalisés. On devrait utiliser de l'eau de contrôle/de dilution pour le dernier rinçage.

Pour les essais visant à établir la CSEO/CMEO ou la CI_p, il faut préparer au moins cinq concentrations d'essai ainsi qu'une solution de contrôle (eau de contrôle/de dilution à 100 %)[m]. On peut utiliser une série géométrique de dilutions, dans laquelle chaque concentration successive s'établit à environ 50 % de la précédente (p. ex., 100, 50, 25, 12,5, 6,3, etc.). On peut aussi choisir des concentrations d'essai à partir d'autres séries logarithmiques appropriées (*cf.* annexe D). En général, on n'améliore pas beaucoup la précision de l'essai en utilisant des échelons plus petits que le facteur de dilution de 50 % (c.-à-d. des concentrations plus proches les unes des autres). Il n'est pas recommandé d'utiliser couramment un facteur de dilution aussi faible que 30 % (p. ex., concentrations de 100, 30, 9, etc.), parce que cela réduit la précision des estimations de la toxicité; cependant, on pourrait y avoir recours en cas de grande incertitude quant à l'intervalle des concentrations qui risquent d'être toxiques.

Lorsqu'on n'a aucune idée de la toxicité de l'échantillon, il est avantageux de procéder à un essai préalable de détermination de l'ordre de grandeur dans l'unique but de choisir les concentrations à utiliser lors de l'essai définitif. Les conditions et les méthodes d'essai peuvent alors être assouplies. Une exposition de 24 h pour déterminer la mortalité des larves à une large gamme de concentrations (couvrant un intervalle d'au moins 1 à 100) devrait aider à sélectionner les concentrations pour l'essai définitif. La concentration maximale de l'essai définitif devrait ne pas avoir produit une mortalité de plus de 20 à 30 % dans l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Si l'on doit respecter des contraintes de temps rigoureuses pour la mise en route de l'essai définitif, on peut opter pour un essai de détermination de l'ordre de grandeur de plus courte durée, par exemple 8 h, qui serait toujours utile.

Des essais à concentration unique pourraient être utilisés à des fins réglementaires (p. ex., essais à résultat unique du type

---

m On peut procéder à un essai préalable (de détermination de l'ordre de grandeur) avant d'entreprendre l'essai définitif; cet essai porte généralement sur une gamme de concentrations plus vaste et se déroule fréquemment en 24 h ou moins.

Tableau 2 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées

Méthodes universelles	
Type d'essai	À renouvellement périodique, durée de sept jours*.
Eau de contrôle/ de dilution	Eau souterraine, eau de surface ou, si nécessaire, eau municipale déchlorée; milieu récepteur prélevé en amont pour évaluer l'effet toxique à un endroit particulier**; eau reconstituée s'il faut assurer un haut degré de normalisation. Oxygène dissous de 90 à 100 % de saturation au moment de l'utilisation.
Poissons	Larves de tête-de-boule écloses depuis 24 h ou moins. Au moins dix larves dans chacun des trois récipients d'essai requis pour chaque concentration; on recommande quatre récipients par concentration.
Contenant et solution	Profondeur minimale de 3 cm et diamètre équivalent; volume d'au moins 250 mL, de préférence de 500 mL.
Température	Moyenne journalière de 25 ± 1 °C, avec fluctuations extrêmes comprises entre 23 et 27 °C.
Oxygène/aération	Pas de préaération sauf si la teneur en oxygène dissous d'une solution d'essai est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation lors de la préparation; dans ce cas, toutes les solutions d'essai doivent être aérées pendant au plus 20 minutes à un débit minimal avant le début de l'essai ou le renouvellement de la solution. La teneur en oxygène dissous doit être comprise entre 40 et 100 % de saturation pendant toute la durée de l'essai, avec un renouvellement plus fréquent des solutions, si nécessaire, pour maintenir la teneur dans cet intervalle. Au besoin, pour se conformer aux objectifs de l'essai, on peut soumettre tous les contenants à une légère aération.
pH	Aucune correction si le pH des solutions d'essai est compris entre 6,5 et 8,5***. Un deuxième essai (à pH corrigé) pourrait s'avérer nécessaire ou pertinent si le pH n'est pas compris dans cet intervalle ou est inférieur à 7,0.
Éclairage	Éclairement maximal de 500 lux à la surface; 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité, de préférence avec transition progressive. De préférence, l'éclairage devrait être assuré par des lampes fluorescentes à spectre continu.
Alimentation	Deux ou trois fois par jour avec des nauplius d'artémia récemment éclos; nourrir au début de l'essai mais ne pas nourrir durant les 12 dernières heures.
Observations	Mortalité et comportement de nage toutes les 24 h; poids sec moyen après sept jours.
Mesures	Température, pH et oxygène dissous : au moins au début et à la fin de chaque période d'exposition de 24 h, dans des concentrations représentatives. Conductivité : au moins au commencement des périodes de 24 h. Dureté de l'eau de contrôle et de la solution d'essai à la plus forte concentration : au début de l'essai.

* Dans des cas particuliers (p. ex., produits chimiques volatils ou instables en solution), il se peut qu'on doive utiliser des essais à renouvellement continu.

** Dans ce cas, on doit prévoir une solution de contrôle additionnelle, constituée de l'eau du laboratoire dans laquelle les poissons ont été élevés.

*** Si le pH n'est pas compris dans cet intervalle ou est inférieur à 7,0, les résultats peuvent indiquer une toxicité attribuable à un pH biologiquement nocif.

Résultats	CSEO/CMEO ou CI_p pour la croissance et la mortalité; le cas échéant, CL_{50} après une durée donnée.
Produits toxiques de référence	Un ou plusieurs des composés suivants : chlorure de sodium, phénol ou zinc; essai de mesure de la CSEO/CMEO ou de la CI_p chaque mois.
Validité de l'essai	L'essai n'est pas valable si plus de 20 % des poissons témoins meurent ou ont un comportement de nage manifestement atypique, ou si le poids moyen des poissons témoins n'est pas d'au moins 250 µg. La validité et l'utilité de l'essai sont douteuses si la différence significative minimale des poids est supérieure à 20 % du poids sec moyen des poissons témoins.

Produits chimiques

Solvants	À utiliser seulement dans des cas particuliers; concentration maximale : 0,1 mL/L.
Concentration	Il est recommandé de mesurer la concentration au début et à la fin des périodes de renouvellement du milieu (24 h) dans les solutions à teneur supérieure, moyenne et inférieure et dans les solutions de contrôle; si les concentrations diminuent de plus de 20 %, reprendre l'essai en prévoyant un renouvellement plus fréquent ou continu des solutions.
Eau de contrôle/ de dilution	Tel qu'indiqué ou selon l'objet de l'essai; eau reconstituée s'il faut assurer un haut degré de normalisation; milieu récepteur lorsqu'on veut étudier les effets toxiques locaux; sinon, eau du laboratoire.

Effluents, élutriats et lixiviats

Échantillons	Dans le cas d'essais à l'extérieur, trois échantillons au minimum sont prélevés ou préparés (élutriats) et utilisés comme le prévoit la sous-section 6.1. Pour les essais sur place, des échantillons sont prélevés quotidiennement et utilisés dans un intervalle de 24 h. Un volume de 4 L est suffisant.
Transport et stockage	Lorsque les échantillons sont chauds (plus de 7 °C), les ramener entre 1 et 7 °C sur de la glace ou des sacs réfrigérants. Les échantillons doivent être transportés entre 1 et 7 °C (de préférence à 4 ± 2 °C), la température étant maintenue au besoin grâce à des sacs réfrigérants; ils ne doivent pas geler pendant le transport. Stocker à l'obscurité entre 1 et 7 °C (de préférence à 4 ± 2 °C). Les essais devraient commencer dans les 24 h et doivent commencer dans les 72 h suivant le prélèvement ou l'extraction.
Eau de contrôle/ de dilution	Tel qu'indiqué ou selon l'objet de l'essai; eau du laboratoire ou milieu récepteur en amont pour les essais de surveillance et de conformité.
Teneur élevée en matières solides	On pourrait faire un deuxième essai sur un échantillon filtré afin d'évaluer l'effet de la présence de matières solides.

Milieux récepteurs

Échantillons	Comme pour les effluents, lixiviats et élutriats.
Transport et stockage	Comme pour les effluents, lixiviats et élutriats.
Eau de contrôle/ de dilution	Tel qu'indiqué ou selon l'objet de l'essai; milieu récepteur en amont pour étudier les effets locaux.

«réussite ou échec»). Pour ces essais, on utiliserait normalement l'effluent, l'élutriat, le lixiviat ou le milieu récepteur non dilué, ou une concentration arbitraire ou prescrite de produit chimique. On aurait recours à des solutions de contrôle de la même façon que pour les essais à concentrations multiples. On ne décrira pas ici explicitement les essais à concentration unique : la marche à suivre est évidente et toutes les règles s'appliquent, a ceci près que l'essai porte sur une seule concentration et une seule solution de contrôle.

On doit prévoir au moins trois répétitions de chaque concentration, y compris les solutions de contrôle*. Cela est nécessaire pour l'analyse statistique des résultats, particulièrement pour le test de Dunnett (Gulley *et al.*, 1989). Il est recommandé, mais pas absolument nécessaire, d'utiliser quatre répétitions, car ce nombre serait nécessaire pour une analyse statistique non paramétrique si les résultats de l'essai ne satisfaisaient pas aux exigences de normalité et d'homogénéité. L'essai doit commencer avec un nombre égal de répétitions pour chaque concentration, y compris les solutions de contrôle. En cas de perte accidentelle d'une solution répétée au cours de l'essai, on peut analyser des séries de données inégales, mais les résultats sont moins probants (Gulley *et al.*, 1989).

Si l'on utilise un milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution, il faudrait préparer une deuxième solution de contrôle en utilisant l'eau du laboratoire dans laquelle les poissons ont été détenus pour la production d'embryons et dans laquelle les embryons se sont transformés en larves. On ne peut utiliser un milieu récepteur s'il est manifestement toxique selon les critères de l'essai auquel il est destiné[n]; en pareil cas, l'eau du laboratoire dans laquelle les poissons se sont reproduits devrait servir d'eau de contrôle/de dilution.

Pour un essai donné, il faut utiliser la même eau afin de préparer la solution de contrôle et toutes les concentrations d'essai. Chaque solution d'essai devrait être bien mélangée avec une baguette de verre, un agitateur en Teflon[MC] ou un autre dispositif non réactif. Sa température devrait être ramenée au besoin à 25 ± 1 °C. Il pourrait être nécessaire d'ajuster le pH de l'échantillon ou des solutions d'essai (*cf.* 4.3.2) ou de procéder à une aération préliminaire des solutions d'essai (*cf.* 4.3.1).

4.2 Mise en route de l'essai

On doit utiliser au moins dix poissons par récipient d'essai, avec un nombre égal dans chacun. Un essai comportant quatre répétitions de cinq concentrations et d'une solution de contrôle requiert donc au moins 240 poissons. Les larves devraient, dans la mesure du possible, provenir d'au moins trois frais différents. Chaque concentration, y compris la solution de contrôle, doit

---

* On estime qu'en portant le nombre de répétitions de deux à trois dans cet essai, on augmente la charge de travail de 15 % seulement tout en améliorant grandement les résultats de l'essai sur le plan de la variabilité et de la sensibilité. On considère que l'addition d'une troisième répétition mérite l'investissement nécessaire (API, 1988). En portant le nombre de répétitions de trois à quatre, on n'obtient qu'une petite diminution additionnelle de la variabilité; un effort accru ne serait pas justifiable de ce fait, mais on recommande ici l'utilisation de quatre répétitions en raison de leur nécessité, peu fréquente mais possible, pour l'analyse statistique.

n Une comparaison de la mortalité et du comportement de nage des poissons dans cette eau de contrôle, par rapport au milieu récepteur de contrôle, permet de distinguer les effets toxiques qui pourraient être attribuables à la présence de contaminants dans l'eau d'amont.

compter le même nombre de répétitions lors de la mise en route de l'essai (au moins trois, *cf.* 4.1).

Les larves doivent être âgées d'au plus 24 h. Il semble que des variations des résultats puissent être causées par une différence d'âge à l'intérieur de la période de 24 h, peut-être parce que les larves très jeunes ayant des vessies natatoires non développées tolèrent moins bien la manipulation. Il serait souhaitable, dans la mesure du possible, de réduire cette source de variation en sélectionnant pour l'essai des larves dotées de vessies natatoires déjà développées (*cf.* figure 3), ce qui indiquerait normalement qu'elles sont âgées de 7 à 24 h. Par ailleurs, une inspection plus fréquente des installations utilisées pour l'éclosion permettrait de sélectionner des larves âgées de 7 à 24 h.

Comme il est possible que les larves issues d'un frai donné soient particulièrement sensibles ou particulièrement tolérantes, on doit tenter de parvenir à l'«homogénéité des unités expérimentales», c'est-à-dire éviter toute différence entre les récipients qui serait imputable au frai. Pour ce faire, il existe deux solutions, qui sont toutes deux valides et adaptées aux mêmes analyses statistiques des résultats (communication personnelle de J.J. Hubert, département de mathématiques et de statistique, Université de Guelph, Guelph, Ont.). Selon la première méthode, on peut regrouper des larves provenant de parents ou de frais différents et ayant été détenues séparément, puis les répartir dans les différents récipients. Selon la seconde méthode, on peut répartir également des larves issues d'un frai donné entre toutes les répétitions de toutes les concentrations d'essai, puis faire de même pour les larves issues d'autres frais jusqu'à l'obtention du nombre total de dix. La seconde méthode requiert plus d'attention et d'efforts sur le plan de l'élevage et des manipulations; elle devrait cependant réduire le «bruit» de la variation entre les différentes répétitions d'une même concentration et éliminer le risque que présente la première méthode d'obtenir une grande proportion de larves faibles ou de larves fortes dans un récipient donné, en supposant qu'existe une telle variation liée au frai. Cette dernière méthode est recommandée par Neville (1989).

Avec l'une ou l'autre de ces méthodes, on doit tenter de parvenir à l'homogénéité en répartissant les poissons dans les récipients de la manière suivante. Il faudrait compter les larves dans une série de petits bechers ou gobelets en plastique, en introduisant une, deux ou trois larves à la fois dans chaque becher jusqu'à ce que l'on ait atteint le nombre total dans tous les récipients. Les poissons ayant une apparence anormale ne devraient pas être retenus pour l'essai. Les poissons devraient être transférés au moyen d'une pipette de grand calibre munie d'une poire en caoutchouc, et l'on doit éliminer tout poisson endommagé ou ayant pu l'être durant le transfert. Le volume d'eau d'élevage transféré dans les récipients d'essai avec les poissons, au cours de leur passage dans la pipette, doit être minimal.

En plus de suivre les méthodes exposées ci-dessus, il faut procéder à une répartition aléatoire rigoureuse des lots de dix larves ou plus (regroupées dans des bechers ou des gobelets) dans les récipients des différentes concentrations et répétitions, ou vice-versa. On doit également assigner aux récipients des positions choisies au hasard dans le bain-marie ou l'installation à température contrôlée. Chaque récipient d'essai devrait porter un code ou une étiquette explicite mentionnant la substance à expérimenter, la concentration d'essai ainsi que la date et l'heure du début de l'essai. La température,

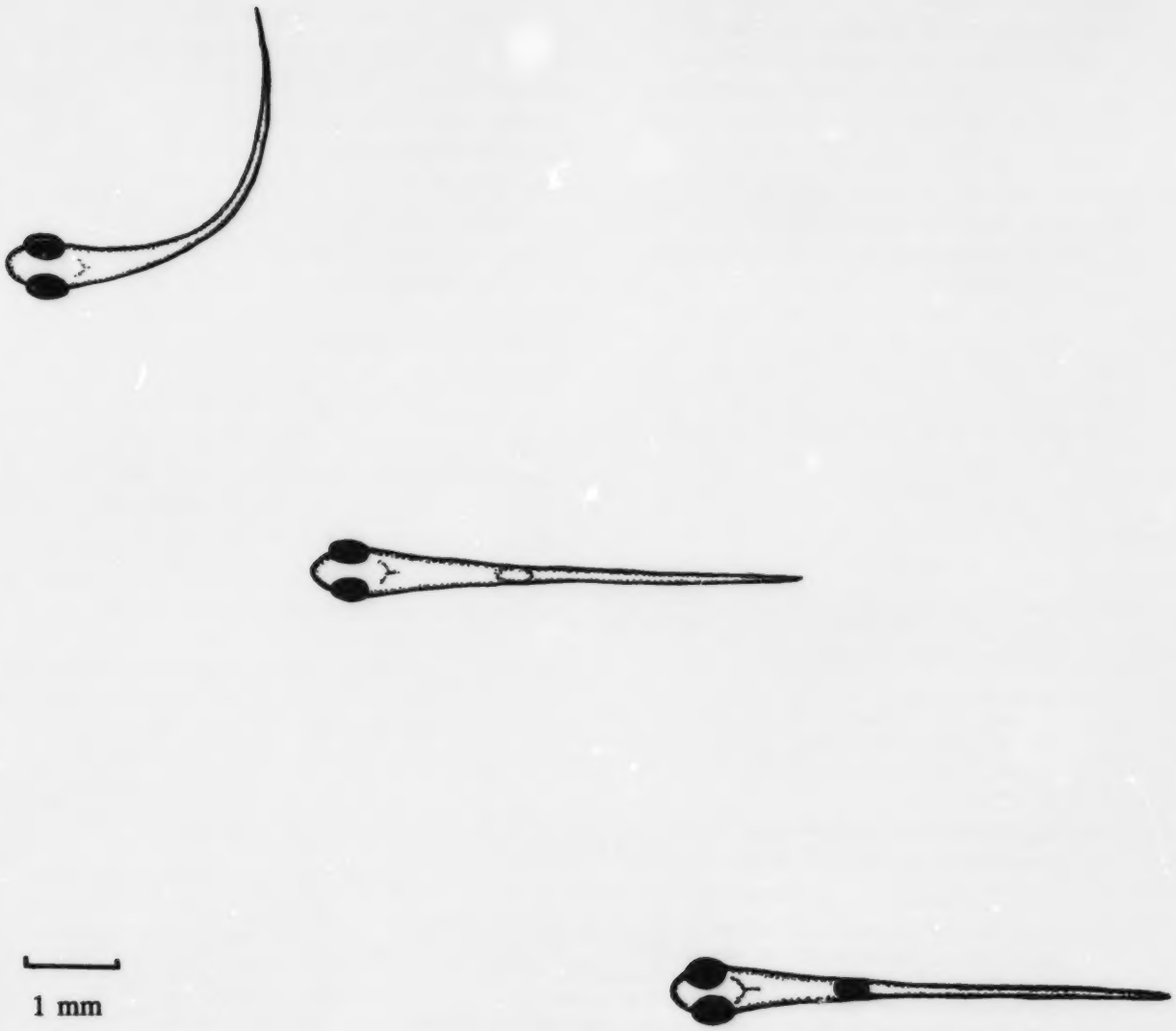


Figure 3 **Vue dorsale de larves de tête-de-boule**
(dessins originaux de C.M. Neville et M.A. White, d'après des spécimens)

En haut à gauche : larve juste après l'éclosion; les yeux sont la caractéristique la plus évidente. Au centre : larve éclose depuis 3 ou 4 h, dont la vessie natatoire n'est pas encore gonflée; elle peut nager rapidement sur le fond du contenant. En bas à droite : larve à vessie natatoire gonflée, âgée de 7 à 24 h; elle peut nager à n'importe quelle profondeur dans l'eau.

la teneur en oxygène dissous et le pH de l'eau des récipients devraient être vérifiés et, si cela est nécessaire ou permis, ramenés à des niveaux admissibles avant l'introduction des poissons (*cf.* 4.2, 4.3.1 et 4.3.2). À titre de vérification des concentrations d'essai, il est recommandé de mesurer la conductivité de chaque nouvelle préparation d'une solution d'essai avant de la répartir dans les récipients d'essai.

4.3 Conditions de l'essai

Il s'agit d'un essai d'une durée de 7 jours avec renouvellement des solutions à des intervalles de 24 h*. Les poissons sont nourris d'artémias.

La température journalière moyenne de toutes les solutions d'essai devrait être de 25 ± 1 °C, les fluctuations extrêmes étant comprises entre 23 et 27 °C, selon des mesures effectuées dans des récipients représentatifs au début et à la fin des périodes de 24 h, c'est-à-dire dans la solution d'essai fraîche et dans la solution usée, juste avant et juste après le renouvellement**.

L'essai n'est pas valable si plus de 20 % des poissons témoins*** meurent ou ont un comportement de nage manifestement atypique, si le poids final moyen des poissons témoins est inférieur à 250 µg° ou

---

* Dans des cas particuliers (p. ex., produits chimiques volatils ou instables en solution), il peut être nécessaire de renouveler plus fréquemment les solutions, de recourir à des essais à renouvellement continu ou encore de modifier la durée de l'essai.

** Bien que les mesures dans la solution usée, après le transfert des organismes dans la solution fraîche, soient en théorie moins pertinentes, elles présentent un avantage considérable, car elles évitent d'endommager les larves avec l'instrument de mesure. La probabilité de dommage n'est peut-être pas élevée dans le cas d'un thermomètre, mais elle augmente considérablement dans le cas des sondes d'oxygénomètre et de pH-mètre, qui sont déplacées dans l'eau.

*** Dans une étude comparative de dix laboratoires, la mortalité moyenne dans les solutions de contrôle a été de 6 % et la mortalité a été de 20 % ou plus dans seulement 16 des 270 récipients de contrôle (API, 1988).

° On peut s'attendre à ce que les larves de tête-de-boule pèsent en moyenne 90 µg au début de l'essai (API, 1988). Au terme d'essais menés selon les règles, les poissons témoins devraient avoir un poids sec moyen de 350 µg dans de l'eau douce (dureté d'au plus 50 mg/L) et de 500 µg dans de l'eau dure ou modérément dure (dureté d'au moins 130 mg/L), et des poids proportionnels à l'intérieur de cet intervalle de dureté. Il est plus difficile de mesurer une différence significative sur le plan statistique lorsque la croissance est moindre, et l'essai devient alors moins sensible. D'après l'expérience acquise au Canada et aux États-Unis, on doit obtenir pour les poissons témoins un poids sec moyen d'au moins 250 µg pour que l'essai soit considéré comme valable.

Dans le rapport de l'API (1988) sur des essais comparatifs interlaboratoires, on a conclu que des variations du poids sec final des larves (de 120 à 650 µg) n'influençaient pas la détermination des résultats. Il n'y avait aucune relation évidente entre la valeur de la CSEO déterminée à un laboratoire donné et la croissance observée chez les larves. Deux des dix laboratoires participants, qui ont tous fait de 12 à 14 essais comparatifs, n'ont pas atteint un poids moyen de 250 µg; cinq d'entre eux ont obtenu une moyenne supérieure à 400 µg, et trois ont obtenu les moyennes les plus élevées, de 600 à 650 µg. On a observé des variations intralaboratoires considérables par rapport à ces moyennes. En dépit des conclusions de l'API, l'expérience des chercheurs canadiens indique qu'une faible croissance des larves (poids final inférieur à 250 µg) est liée à une faible discrimination des tests statistiques et à une piètre sensibilité de l'essai.

Des laboratoires expérimentés des États-Unis ont obtenu de bons résultats en matière de croissance; ainsi, on a obtenu une moyenne de 790 µg dans 39 groupes témoins, la plus faible valeur étant de 470 µg (Pickering, 1988), ou encore des moyennes de 540 µg dans diverses eaux de surface et de 522 µg dans de l'eau douce (Norberg et Mount, 1985). Dans un essai comparatif mené par dix laboratoires de la région de San Francisco, on a obtenu un poids final moyen de 500 µg avec un écart-type de 180 µg, et la mortalité moyenne était de 3 % (Anderson et Norberg-King, 1991).

si la variabilité des répétitions est trop élevée (pour de plus amples détails, *cf.* 4.5).

4.3.1 Oxygène dissous et aération

Seulement lorsque la teneur en oxygène dissous mesurée est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation en air dans une ou dans plusieurs solutions d'essai au moment de leur préparation pour la mise en route de l'essai, toutes les solutions devraient être aérées avant l'introduction des larves («préaération»). L'aération devrait être assurée par des bulles d'air comprimé exempt d'huile, d'une taille de 1 à 3 mm, produites au moyen d'une pipette en verre jetable; elle devrait se faire au débit minimal requis pour l'aération du récipient particulier et du volume de liquide en cause. La durée de la préaération devrait être limitée à 20 minutes ou, si cette durée est plus courte, au temps voulu pour obtenir 40 % de saturation en air dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée (ou 100 % de saturation, s'il y avait sursaturation)[p]. Il faudrait mettre fin à la préaération après 20 minutes et mettre l'essai en route, que l'on ait ou non obtenu de 40 à 100 % de saturation dans toutes les solutions d'essai. Toute préaération doit être signalée dans le procès-verbal de l'essai (*cf.* section 8).

La teneur en oxygène dissous doit être consignée au début de chaque période de 24 h dans des concentrations représentatives des solutions d'essai fraîchement préparées, dont la concentration la plus élevée; les exigences mentionnées au paragraphe précédent s'appliquent également dans ce cas. Il faudrait également effectuer des mesures dans des concentrations représentatives à la fin des périodes de 24 h, afin d'établir l'ampleur de l'appauvrissement de l'oxygène avant le renouvellement des solutions*.

La teneur en oxygène dans les récipients ne devrait pas descendre au-dessous de 40 % de saturation (3,3 mg/L). Si cela se produit, l'essai ne permet plus d'évaluer la toxicité intrinsèque de la substance à expérimenter; cependant, il permet encore d'évaluer de manière valable l'effet total de la substance (p. ex., un effluent), y compris son influence sur le plan de la désoxygénation[q]. Les

---

p L'aération peut éliminer des produits chimiques volatils de la solution ou accroître leur taux d'oxydation et de dégradation en d'autres substances. Cependant, l'aération des solutions d'essai avant l'exposition des poissons peut s'avérer nécessaire en raison de la demande en oxygène de la substance à expérimenter (p. ex., appauvrissement de l'oxygène dans l'échantillon pendant son stockage). L'aération aide aussi au remélange de la solution d'essai. S'il est nécessaire d'aérer une solution quelconque, *toutes* les solutions doivent subir le traitement prévu à la division 4.3.1.

* On peut mesurer la teneur en oxygène dissous d'une solution d'essai après l'avoir retirée du récipient en la siphonnant dans une bouteille à échantillon ou par un autre moyen qui ne cause pas d'aération, de façon à éviter d'endommager les larves (*cf.* la note en bas de page de la sous-section 4.3 concernant la mesure de la température).

q On devrait être conscient du fait que la limite inférieure de 40 % de saturation (3,3 mg/L) pour l'oxygène dissous dans les solutions d'essai est arbitraire et que des teneurs en oxygène supérieures à ce niveau imposent aussi un certain stress aux poissons. À une teneur de 5 mg/L, la croissance des larves de tête-de-boule est inférieure à ce qu'elle est à 7,2 mg/L (Brungs, 1971a). En fait, toute réduction au-dessous du niveau de saturation entraîne une certaine charge métabolique pour les poissons et réduit leur performance (Doudoroff et Shumway, 1970). Par conséquent, à des teneurs en oxygène supérieures à la limite de 3,3 mg/L, on pourrait s'attendre à ce que le stress lié au manque d'oxygène interagisse avec le stress causé par les produits toxiques et qu'il soit mesuré avec l'effet de l'échantillon, qu'il s'agisse d'un effluent ou d'une autre substance à expérimenter. Dans la présente méthode d'essai, on accepte que cette interaction fasse partie de l'effet mesuré.

mesures initiales permettent de prédire des problèmes potentiels en matière d'oxygène dissous, auquel cas il est nécessaire de procéder à des vérifications régulières de la concentration en oxygène. L'utilisation obligatoire d'une eau de contrôle/de dilution saturée en oxygène et le renouvellement quotidien des solutions d'essai maintiendront, dans la plupart des cas, la teneur en oxygène dissous à des niveaux supérieurs à ceux qui sont gravement dommageables pour les larves et exercent une influence considérable sur les résultats. Si la substance à expérimenter a une demande en oxygène élevée, il pourrait être nécessaire de renouveler plus fréquemment les solutions d'essai afin de maintenir la teneur en oxygène dissous à au moins 40 % de saturation. Lorsque l'augmentation de la fréquence du renouvellement n'améliore pas la situation et que les objectifs de l'essai exigent une teneur en oxygène dissous d'au moins 40 % de saturation pour que l'évaluation de la toxicité soit valable, on peut aérer tous les récipients à raison d'approximativement 100 bulles par minute à l'aide de la pointe d'une pipette. Il convient de minimiser la turbulence afin d'éviter de perturber les poissons. Toute aération en cours d'essai doit être signalée dans le procès-verbal de l'essai (*cf.* section 8).

Il se peut aussi que les objectifs de l'essai exigent l'inclusion de la demande en oxygène dans l'effet total de l'échantillon, auquel cas on devrait conserver la fréquence quotidienne du renouvellement et ne pas avoir recours à l'aération.

4.3.2 pH

Le pH devrait être mesuré dans la solution de contrôle ainsi que dans les concentrations supérieure, moyenne et inférieure au début de l'essai, avant l'introduction des poissons. Le pH devrait également être mesuré dans des récipients représentatifs au début et à la fin de chaque période de 24 h, c'est-à-dire dans la solution d'essai fraîche et dans la solution usée, juste avant ou juste après le renouvellement*.

Les essais de toxicité devraient normalement être effectués sans ajustement du pH. Il se peut qu'un échantillon de produit chimique, d'eau usée ou de milieu récepteur produise, pour une solution d'essai, un pH qui se situe à l'extérieur de l'intervalle de 6,5 à 8,5 et que l'on cherche à évaluer des produits chimiques toxiques plutôt que les effets nocifs ou modificateurs du pH; en pareil cas, on devrait ajuster le pH des solutions d'essai ou de l'échantillon avant d'y déposer les poissons, ou effectuer parallèlement un deuxième essai (avec ajustement du pH) au moyen d'une partie du même échantillon[r].

---

* *Cf.* la note en bas de page de la sous-section 4.3 concernant les mesures dans la solution usée.

r La raison qu'on cite le plus souvent pour ne pas ajuster le pH des solutions ou de l'échantillon est qu'il pourrait exercer une forte influence sur la toxicité des produits chimiques ou des substances contenues dans les eaux usées. Pour les concentrations (généralement) faibles d'eaux usées qu'on trouve dans les milieux récepteurs après dilution, toute modification du pH naturel (et toute modification concomitante de la toxicité) devrait être acceptée comme partie intégrante de la pollution. C'est pourquoi on en arrive à la conclusion que le pH ne devrait pas être ajusté au cours des essais, ce qui constitue la règle à suivre dans la présente méthode, si le pH des solutions d'essai est compris entre 6,5 et 8,5.

Certains produits chimiques et eaux usées entraînent cependant des niveaux de pH ayant des effets sublétaux ou létaux directs dans les solutions à concentration élevée, particulièrement dans le cadre d'essais de surveillance ou de conformité portant sur des effluents non dilués. Il semble peu probable qu'un expérimentateur cherche

Pour ce deuxième essai, avant l'exposition des poissons, le pH initial de l'échantillon ou de chaque solution d'essai[s] pourrait, selon les objectifs de l'essai, être neutralisé (ramené à la valeur de 7,0) ou ramené à une valeur correspondant, à 0,5 unité près, au pH de l'eau de contrôle/de dilution. Selon une autre démarche admissible pour ce deuxième essai, on peut ramener le pH de chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) à une valeur de 6,5 à 7,0 (si l'échantillon d'essai a ou produit un pH inférieur à 6,5) ou de 8,0 à 8,5 (si l'échantillon a ou produit un pH supérieur à 8,5). Des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) de titre inférieur ou égal à 1 *N* devraient normalement être utilisées pour toutes les opérations d'ajustement du pH. Certaines situations (p. ex., des échantillons d'effluents à pouvoir tampon élevé) pourraient nécessiter l'utilisation de teneurs supérieures d'acide ou de base.

Les expérimentateurs utilisant la présente méthode d'essai sur la tête-de-boule devraient savoir qu'on a observé d'importants effets sur la reproduction et la survie des larves à un pH d'environ 6, ainsi que des effets négligeables à un pH de 6,6. Comme on l'a indiqué ailleurs (*cf.* 2.3.7, note *h*), un pH de 6,8 et, de préférence, de 7,0 est recommandé comme limite inférieure permettant d'éliminer les effets intrinsèques du pH.

Dans certains cas, on pourrait souhaiter d'effectuer l'essai le plus sensible possible pour la détection des produits chimiques toxiques, au lieu d'inclure le pH dans l'effet total d'un produit chimique, d'un effluent, d'un élutriat ou d'un lixiviat. Il faudrait alors éliminer les effets négatifs du faible pH sur la croissance et la survie des larves en augmentant le pH des solutions d'essai, au besoin, à une valeur d'au moins 6,8 ou, de préférence, d'au moins 7,0[h].

Abernethy et Westlake (1989) fournissent des lignes directrices utiles pour l'ajustement du pH. Il faudrait laisser s'équilibrer, après chaque addition d'acide ou de base, les aliquotes de solutions d'essai ou d'échantillons faisant l'objet d'un ajustement du pH[s]. Le délai nécessaire pour atteindre l'équilibre dépend du pouvoir tampon de la solution ou de l'échantillon. Pour les échantillons d'effluents, il est recommandé de prévoir une durée de 30 à 60 minutes pour l'ajustement du pH (Abernethy et Westlake, 1989). Une fois l'essai mis en route, le pH de chacune des solutions d'essai

---

essentiellement à savoir si le pH extrême d'un effluent non dilué serait nocif pour les poissons, étant donné que ce pH ne serait pas représentatif des conditions qu'on observerait après une dilution, même modérée, dans le milieu récepteur. Si le pH en soi présentait un intérêt prépondérant, un essai de toxicité ne serait sans doute pas nécessaire, puisque la létalité d'un pH extrême est bien établie et qu'on pourrait évaluer beaucoup plus économiquement les risques par une simple mesure chimique. L'expérimentateur cherche généralement à savoir si des substances toxiques sont présentes dans les eaux usées; pour ce faire, il faudrait éliminer tout masquage dû à une action létale du pH. Ce principe conduit à l'utilisation d'échantillons ou de solutions d'essai à pH corrigé lorsque cela est indiqué. Exactement de la même façon, on normalise la température et l'oxygène dissous dans les essais de toxicité même si les eaux usées elles-mêmes avaient une température de 90 °C ou une teneur en oxygène dissous faible (p. ex., moins de 2 mg/L), car ces deux conditions pourraient être rapidement toxiques en elles-mêmes. La présente méthode prévoit donc l'ajustement du pH avant l'essai ou la tenue d'un second essai à pH ajusté, la méthode particulière d'ajustement du pH dépendant des objectifs de l'essai.

s Lorsqu'il faut procéder à un ajustement du pH pour un essai portant sur un produit chimique ou sur un échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat, il faut normalement corriger séparément le pH de chaque solution d'essai ou de contrôle; pour un essai portant sur un échantillon de milieu récepteur, il faut plutôt ajuster le pH d'une aliquote de l'échantillon non dilué, avant de préparer les concentrations d'essai.

est mesuré régulièrement (*cf.* 4.4), mais il n'est pas ajusté.

Lorsque l'essai de toxicité vise à permettre de mieux comprendre la nature des substances toxiques présentes dans un échantillon d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou de milieu récepteur, on utilise souvent l'ajustement du pH, en conjonction avec un certain nombre d'autres techniques de traitement (p. ex., l'oxydation, le filtrage, l'extraction à l'air et l'addition d'agents chélateurs), pour caractériser la toxicité de l'échantillon. Mount et Anderson-Carnahan (1988) comptent l'ajustement du pH parmi neuf techniques d'évaluation d'identification de la toxicité qui, lorsqu'on les applique à des échantillons aqueux de toxicité aiguë, constituent une méthode utile pour déterminer la nature physique ou chimique des substances toxiques et leur sensibilité à la détoxication.

4.3.3 Alimentation

Les poissons sont nourris de nauplius d'artémia vivants (*cf.* 2.3.9 et annexe C) immédiatement après le début de l'essai. L'objectif est que les poissons puissent disposer constamment d'artémias vivantes durant les heures du jour, mais il ne faut pas que ces crustacés soient présents en excès dans les récipients d'essai, et ce pour deux raisons : ils adsorberaient une partie de la substance toxique et mourraient après un certain temps dans l'eau douce, ce qui pourrait réduire le niveau d'oxygène dissous.

Les lots de dix poissons devraient être nourris avec au moins 1 500 nauplius par jour et, de préférence, avec 2 250 nauplius par jour. Cette quantité devrait être répartie en deux rations quotidiennes, la première étant distribuée tôt le matin. Les rations supérieures n'améliorent pas la croissance (*cf.* annexe C; Silberhorn, 1989). Il faudrait ajuster le nombre de nauplius en fonction du nombre de larves présentes dans les récipients.

On ne nourrit pas les poissons durant les 12 dernières heures de l'essai, afin d'éviter de peser les aliments se trouvant dans leur tube digestif.

4.3.4 Renouvellement des solutions d'essai

Il s'agit d'un essai à renouvellement périodique dans lequel les solutions doivent être renouvelées presque complètement (au moins à 80 %) à des intervalles de 24 h après le début de l'essai. On procède normalement par siphonnage ou à l'aide d'une pipette. Il est souhaitable de remplacer les solutions selon un ordre aléatoire parmi les divers contenants d'une concentration donnée, en particulier s'il est difficile de maintenir l'homogénéité de la substance à expérimenter en raison de la décantation de certains de ses éléments.

Durant le renouvellement, il faudrait commencer par retirer les artémias mortes et les autres détritus se trouvant au fond de chaque récipient, puis aspirer la solution restante jusqu'à une hauteur de 7 à 10 mm (suffisante pour permettre aux poissons de continuer à nager). Selon la forme du récipient, il pourrait être nécessaire de l'incliner pour parvenir à retirer 80 % de la solution en conservant la hauteur minimale. On ajoute lentement la solution d'essai fraîche jusqu'à l'obtention du volume total d'origine de solution d'essai dans chaque récipient. Il convient de procéder avec précaution durant cette opération afin d'éviter d'endommager les poissons; pour rendre les larves plus visibles, on peut travailler sur une table lumineuse. Dans tous les cas, la solution qui est retirée par siphonnage ou par une autre méthode doit être transférée dans un plateau blanc de sorte que l'on puisse vérifier si on n'a pas prélevé de larves par mégarde. Ces larves risquent

fort d'être endommagées et devraient être éliminées; les résultats de l'essai devraient être analysés comme si elles n'avaient pas été présentes.

Le siphonnage est beaucoup plus facile à exécuter sans risquer de retirer par mégarde des poissons lorsqu'on emploie des récipients ayant une vidange grillagée. Si l'on utilise des contenants à fond grillagé, une fois les débris siphonnés, on retire rapidement mais doucement ces contenants des récipients de solution d'essai usée et on les place dans des récipients de solution fraîche. Le fait que les larves se retrouvent momentanément hors du liquide ne semble pas les affecter, si l'opération est faite avec délicatesse. On peut avoir recours à d'autres techniques si l'appareillage est fait des matériaux non toxiques mentionnés à la sous-section 3.3, si la solution est renouvelée dans la proportion requise et si les organismes témoins ont une croissance acceptable[o]. Par exemple, Parrott (1988) a mis au point une technique de «transfert en immersion» des larves d'un contenant à fond grillagé à un nouveau contenant, ce qui permet de placer les poissons dans des contenants propres au début de chaque période de 24 h.

4.4 Observations et mesures

La mortalité dans chaque récipient d'essai doit être déduite grâce au décompte des larves qui nagent, effectué à des intervalles de 24 h à partir du début de l'exposition jusqu'à la fin de l'essai, après sept jours d'exposition. Il faudrait consigner toute perte d'équilibre ou tout comportement de nage anormal en même temps que la mortalité.

Les poissons sont considérés morts lorsqu'ils n'ont aucune activité de nage, même lorsqu'ils sont stimulés par un jet peu puissant de solution d'essai produit par une pipette de grand calibre. Tout poisson mort devrait être éliminé. Souvent, l'examen ne permet pas de détecter les larves mortes parce qu'elles se décomposent rapidement et qu'on ne peut les distinguer des débris au fond du récipient.

À la fin de l'exposition de sept jours, les poissons vivants sont comptés, séchés et pesés. Pour *chaque récipient* de solution d'essai, on détermine le poids sec du lot de poissons. On peut transférer chaque larve du récipient d'essai à un récipient de rinçage contenant de l'eau de dilution propre afin d'éviter d'inclure des débris lors de la pesée. Le rinçage devrait être bref et ne pas durer plus de cinq minutes pour la première larve transférée. Après le rinçage, on peut regrouper les poissons dans une épuisette et les transférer dans des plateaux de pesée au moyen de pinces fines, en veillant à ne briser aucune de leurs parties. On peut utiliser avantageusement d'autres techniques[t].

Les poissons peuvent être séchés immédiatement dans des nacelles de pesée en aluminium très petites, tarées et numérotées, à une température de 100 °C

---

t On peut utiliser des méthodes équivalentes pour recueillir les poissons à la fin de l'essai, s'il est prouvé qu'elles sont satisfaisantes. Une méthode employée avec succès dans un laboratoire canadien consiste à verser le contenu d'un récipient d'essai sur un filet à mailles de 1 mm puis à y verser immédiatement de l'eau très chaude, de façon à tuer et à «fixer» les poissons, qui sont alors faciles à saisir avec des pinces. Il faut encore les rincer.

On peut aussi employer d'autres méthodes de pesée. Ainsi, on peut peser ensemble des paires de plateaux ou de nacelles de pesée disposés en carré latin de sorte que chaque plateau soit pesé deux fois (plateaux 1 et 2, puis 1 et 3, puis 2 et 3). Le poids de chaque plateau peut ensuite être estimé algébriquement.

pendant au moins 2 h et pas plus de 24 h. Lorsqu'on retire les nacelles du four, on les transfère immédiatement dans un dessiccateur, puis on les en retire l'une après l'autre, au hasard, et on les pèse sur une balance permettant des mesures fiables jusqu'à 10 µg. Les poissons absorbant rapidement la vapeur d'eau, il est nécessaire de peser rapidement les nacelles en prenant le même temps pour chacune. (Cependant, il faut faire attention car un mouvement rapide pourrait faire sortir des larves non fixées de la nacelle.) Pour la pesée, il faudrait retirer les plateaux selon un ordre aléatoire, replacer le premier plateau pesé dans le dessiccateur et le peser à nouveau à la fin pour mesurer le gain d'eau dans les derniers plateaux pesés. Le gain ne devrait pas être supérieur à 5 %[t]; s'il l'était, on pourrait sécher encore les plateaux pendant au plus 2 h et les peser à nouveau. Quelques nacelles de pesée devraient être tarées, séchées et pesées sans poisson, et les résultats devraient être conformes aux normes de contrôle de la qualité du laboratoire. On calcule ensuite le poids sec moyen par poisson. Par ailleurs, à la fin de l'essai, on peut conserver les poissons dans une solution d'éthanol à 70 % et, dans les deux semaines qui suivent, les rincer à l'eau distillée avant de les sécher et de les peser de la manière décrite pour les poissons non conservés.

Comme le prévoit la sous-section 4.3, les mesures physico-chimiques effectuées pendant l'essai devraient inclure la température, la teneur en oxygène dissous et le pH dans des récipients d'essai représentatifs au début et à la fin de chaque période de 24 h. La conductivité devrait également être mesurée dans les solutions d'essai, au moins au début des périodes de 24 h. La dureté de l'eau de contrôle/de dilution et, au minimum, de la concentration d'essai la plus élevée devrait être mesurée et consignée au début de l'essai.

4.5 Résultats et calculs

L'essai produit deux résultats : le premier est fondé sur l'inhibition de la croissance des poissons, mesurée par le poids sec moyen des lots de poissons placés dans les récipients d'essai, et le deuxième sur la mortalité. Dans les deux cas, l'effet nocif est évalué par comparaison avec les poissons témoins. Le plus sensible des deux effets est retenu comme l'indice définitif de la toxicité[u]. De plus, il faudrait consigner tout

---

u La longueur des poissons ne devrait pas servir de critère d'effet parce que l'augmentation de l'épaisseur et du poids du corps chez les poissons en santé dans les derniers jours de l'essai ne se reflète pas adéquatement sur le plan de la longueur (Neville, 1989).

On pourrait penser que la croissance serait à la fois un critère d'effet beaucoup plus sensible que la mortalité et un critère supérieur, parce qu'on s'intéresse aux effets sublétaux, mais cela n'est pas nécessairement le cas dans cet essai. En effet, la mort des larves peut apparemment être l'un des effets les plus sensibles de tout le cycle biologique de la tête-de-boule. Après un grand examen des essais sur l'ensemble du cycle biologique et sur ses premiers stades, Woltering (1984) a conclu que la mortalité des poissons aux premiers stades du cycle était significative à la CMEO dans plus de la moitié des essais. Dans des essais comparatifs auxquels ont participé dix laboratoires, la sensibilité relative de la croissance et de la mortalité a varié selon les substances à expérimenter. Les deux CSEO calculées pour la croissance et la mortalité étaient presque identiques pour les essais portant sur du pentachlorophénate et sur l'effluent d'une raffinerie de pétrole, mais la mortalité était parfois l'effet le plus sensible pour les essais portant sur le dichromate de potassium et sur un autre effluent industriel (API, 1988). Si l'on compare seulement les résultats des essais les plus fructueux, au terme desquels le poids final des larves témoins dépassait 250 µg, les résultats relatifs à la croissance étaient beaucoup plus sensibles que ceux relatifs à la mortalité; la croissance était l'effet le plus sensible dans 35 cas, la mortalité dans deux cas, et on a obtenu des résultats égaux dans huit cas.

cas de perte d'équilibre ou de changement brusque du comportement de nage chez les larves, car ces paramètres pourraient être utilisés comme critères d'effet ou de validité de l'essai.

À la fin de chaque exposition, on consigne le nombre de poissons vivants et le nombre de poissons morts pour chaque contenant de la solution de contrôle et des différentes concentrations d'eau usée ou de produit chimique. (Les poissons qui ont été accidentellement tués ou éliminés devraient être déduits du total comme s'ils n'avaient pas été soumis à l'essai.) On calcule le poids sec moyen par poisson pour les sujets ayant survécu dans chaque contenant (c.-à-d. dans chaque répétition de chaque concentration et de la solution de contrôle).

L'essai n'est pas valable si la mortalité est supérieure à 20 % chez les poissons témoins ou si plus de 20 % d'entre eux sont moribonds, montrent des signes de perte d'équilibre ou ont un comportement de nage atypique. L'essai n'est pas valable si le poids moyen final des poissons témoins n'atteint pas 250 µg lorsque les poissons sont séchés et pesés immédiatement après l'essai; si les poissons sont d'abord conservés dans une solution d'éthanol à 70 %, leur poids moyen doit être de 200 µg pour que l'on puisse considérer que l'essai est valable. En adoptant des méthodes raisonnables, il ne devrait pas être difficile d'atteindre des poids moyens de 350 µg dans l'eau douce et de 500 µg dans l'eau dure*,o. Si la différence significative minimale des poids moyens des poissons, obtenue par le test de Dunnett (*cf.* ci-dessous), est supérieure à 25 % du poids moyen des poissons témoins, la variabilité des résultats est telle qu'il faudrait mettre en question la validité et l'utilité des résultats.

Diverses valeurs peuvent être déduites des mesures faites à la fin de l'essai; la justification et les méthodes de calcul sont examinées en détail dans un rapport de l'EPA (1989). La concentration sans effet observé (CSEO) et la concentration minimale avec effet observé (CMEO) peuvent être déduites statistiquement par l'application de la méthode de vérification des hypothèses, qu'il est recommandé d'utiliser comme technique de base. Il y aurait lieu de consulter un statisticien pour les analyses des résultats.

Dans le cas du poids des poissons, la CSEO et la CMEO sont déterminées à partir du poids sec final des lots de poissons dans

---

Les auteurs de l'étude de l'API signalent que la mesure du poids des poissons a accru la durée de travail du personnel d'environ 50 % par rapport à la simple observation de la mortalité, mais cette estimation semble exagérément élevée. Le prix d'un four et d'une balance sensible devrait aussi être ajouté au coût d'exécution de l'essai si une entreprise était tenue de surveiller ses effluents sur place au moyen de cet essai, ou si elle choisissait de le faire. L'API (1988) suggère que dans les cas où, pour un effluent particulier, on a établi que la mortalité est à peu près aussi sensible que la croissance, il serait très économique de surveiller cet effluent en contrôlant uniquement la mortalité des larves de tête-de-boule.

D'après l'expérience acquise au Canada, la pesée des larves ajoute environ une demi-journée de travail à la durée de l'essai. Dans la plupart des cas, la probabilité d'une sensibilité accrue de l'essai justifierait qu'on investisse le temps et les efforts nécessaires. Si l'on ne procède pas à la pesée, le procès-verbal de l'essai devrait clairement l'indiquer.

* Si le poids moyen des poissons témoins est supérieur à la valeur requise de 250 µg mais inférieur aux valeurs souhaitables de 350 à 500 µg, cela pourrait indiquer que l'alimentation ou d'autres conditions étaient peu favorables, quoique les résultats de l'essai puissent encore fournir des renseignements utiles (*cf.* 4.3, note *o*).

chaque contenant de la solution de contrôle et des diverses concentrations d'eau usée ou de produit chimique. Lorsque, à une concentration donnée, toutes les larves de tous les contenants sont mortes, cette concentration est exclue de l'analyse. Dans le cas de la mortalité, on détermine séparément la CSEO et la CMEO, de la même façon. La paire la plus basse de CSEO/CMEO, pour la croissance ou la mortalité, est retenue à titre de résultat global de l'essai.

Les méthodes à employer pour calculer la CSEO et la CMEO sont celles qui sont indiquées dans le programme d'ordinateur TOXSTAT[v] (Gulley *et al.*, 1989), dont on peut se procurer une version à jour en communiquant avec Environnement Canada (*cf.* annexe B). On commence par vérifier la normalité et l'homogénéité des données et on applique des tests appropriés de signification selon différents types précis de distribution. Le programme TOXSTAT prévoit aussi des tests pour les cas où le nombre de contenants n'est pas le même pour toutes les concentrations, par suite de pertes accidentelles ou pour toute autre raison. Généralement, on vérifie les différences observées entre chaque concentration d'essai et la solution de contrôle au moyen du test de Dunnett, une méthode à comparaisons multiples (EPA, 1989). Le test de Dunnett fournit une estimation de la différence significative minimale, qui correspond à la différence des

---

v Les méthodes indiquées dans le programme TOXSTAT (Gulley *et al.*, 1989) ne sont pas reprises en détail ici puisqu'elles sont très faciles à suivre dans la description écrite qui accompagne le programme enregistré sur disquette. Essentiellement, la normalité des données est évaluée au moyen du *test de Shapiro-Wilks*, et leur homogénéité au moyen du *test de Bartlett*. Lorsque les données ne correspondent pas aux exigences, il est possible de les transformer au moyen de logarithmes ou de fonctions arc sinus. Toutefois, on doit comprendre que la transformation pourrait diminuer la sensibilité de l'analyse ainsi que la capacité de l'essai de toxicité de détecter des différences.

Lorsque les données sont régulières ou qu'elles peuvent être rendues régulières par des transformations appropriées, on procède à une analyse de la variance. Ensuite, on a recours au *test de Dunnett*, un test à comparaisons multiples qui est appliqué à chacune des concentrations pour déterminer les différences significatives par rapport à la solution de contrôle. Ce test permet aussi d'estimer la différence significative minimale (DSM) entre les groupes, c'est-à-dire la différence des poids moyens ou des mortalités moyennes qui devrait exister entre le groupe témoin et un groupe soumis à l'essai avant qu'on puisse conclure à une différence significative. Si la DSM des poids se situe entre 10 et 25 % du poids sec moyen des poissons témoins, on devrait considérer que le test fournit une évaluation raisonnable de la toxicité sublétale. Une DSM inférieure à 10 % du poids moyen des témoins se situe vraisemblablement à l'intérieur de l'intervalle de variation possible chez les témoins mêmes, tandis qu'une DSM supérieure à 25 % du poids moyen des témoins donne à penser que l'essai est moins sensible qu'on peut le souhaiter pour ce qui est de détecter un effet (Neville, 1989 et communication personnelle).

Le *test de Williams* est recommandé comme substitut plus puissant du test de Dunnett (*cf.* 4.5). À l'heure actuelle, il ne semble pas y avoir de lignes directrices pour ce qui est d'utiliser les valeurs calculées au moyen du test de Williams pour évaluer la qualité générale de l'essai et de ses résultats. Lorsque le nombre de contenants n'est pas le même pour toutes les concentrations, on emploie plutôt le *test t de Bonferroni*.

Lorsqu'un ensemble de données ne répond pas aux exigences de normalité ou d'homogénéité et ne peut être transformé pour y répondre, on peut utiliser des tests non paramétriques compris dans le programme TOXSTAT (le *test de Steel* et le *test de Wilcoxon*, applicable lorsque les nombres de contenants d'essai sont inégaux). Ces options non paramétriques constituent des outils puissants pour le traitement de données dont la distribution n'est pas normale. Ils sont toutefois moins puissants que les tests paramétriques lorsqu'ils sont appliqués à des données qui ont une distribution normale; dans ce cas, ils pourraient ne pas détecter des différences réelles d'effet et conduire à une sous-estimation de la toxicité sublétale. En outre, il faut se rappeler que *quatre* répétitions sont nécessaires pour qu'on puisse les employer.

poids moyens ou des mortalités moyennes qui devrait exister entre la solution de contrôle et une concentration d'essai avant qu'on puisse conclure que cette concentration a un effet significatif. Cependant, ce test ne tient pas compte de la valeur des concentrations d'essai; il ne constitue donc pas une façon particulièrement efficace de distinguer un effet toxique (Masters *et al.*, 1991). Le test de Williams est également disponible dans le programme TOXSTAT; il est conçu de façon à être sensible aux effets attribuables à l'accroissement des concentrations de substances toxiques (Gulley *et al.*, 1989). Le test de Williams est recommandé comme substitut du test de Dunnett.

On calcule souvent la moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO, parce qu'il est plus pratique d'avoir une seule valeur plutôt que deux. Cette valeur peut être utilisée et consignée, pourvu qu'on reconnaisse qu'il s'agit d'une estimation arbitraire d'un seuil d'effet qui pourrait en fait se situer n'importe où dans l'intervalle entre la CSEO et la CMEO. La valeur calculée de la moyenne géométrique dépend des concentrations sur lesquelles le chercheur a fixé son choix en vue de l'essai. Il est impossible de calculer les limites de confiance d'une moyenne géométrique, non plus que d'une CSEO ou d'une CMEO. Aux États-Unis, la moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO est souvent appelée «seuil de toxicité chronique» (*chronic value*), mais cela est erroné dans le cas qui nous occupe, parce

---

Une autre option pour l'analyse des résultats pourrait être de comparer la biomasse totale par contenant aux diverses concentrations. Si les nombres initiaux de poissons étaient différents dans les divers contenants, on pourrait comparer les quotients de la biomasse totale survivant dans le contenant par le nombre de poissons qui se trouvaient dans le contenant au début de l'essai. On peut justifier cette méthode comme étant plus rationnelle; en particulier, il est utile de combiner les données sur la mortalité et sur la croissance en une seule valeur. Cette méthode deviendra probablement plus répandue dans l'avenir mais, pour le moment, elle ne semble pas très utilisée, ce qui fait qu'on ne peut pas la considérer comme étant d'usage courant. On pourrait encore la perfectionner, notamment en corrigeant les résultats concernant la mortalité dans les solutions d'essai pour tenir compte de la mortalité dans la solution de contrôle. (Les poissons accidentellement tués par l'expérimentateur ne seraient évidemment pas comptés dans le nombre total de poissons enregistré au début de l'essai.)

Pour compléter ou remplacer utilement ces mesures d'effet, on peut calculer la concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné (CI_p). Elle fournit une estimation ponctuelle, calculée par interpolation, d'une concentration unique qui provoque le pourcentage d'effet précisé, plutôt qu'une paire de concentrations comme la CSEO et la CMEO. Ces dernières ont le grave inconvénient de ne pas permettre le calcul de la variance et des limites de confiance. La CI_p est donc utile pour comparer la toxicité de diverses eaux usées ou de divers produits chimiques, ce qu'on ne saurait faire de façon aussi logique, ou avec des tests de mesure des différences significatives, au moyen de la méthode de vérification des hypothèses qui sert à calculer la CSEO/CMEO. Il faut se rappeler qu'une CI_p, quelle qu'elle soit (CI_{20}, CI_5 ou CI_1) n'est toujours, par définition, qu'une concentration qui cause un pourcentage d'effet donné; techniquement parlant, il ne s'agit pas d'une concentration sans effet. Cette question est bien examinée dans un supplément récent à la méthode américaine (EPA, 1989).

Une estimation de la CI_{20} ou de la CI_{25} relative au poids, c'est-à-dire de la concentration causant une réduction de 20 ou de 25 % du poids sec des poissons par rapport à celui des témoins, serait souvent un résultat de base utile. La CI_{20} (ou la CI_{25}) pourrait être lue sur un graphique de la réduction du poids (en pourcentage) par rapport au logarithme de la concentration d'essai, qu'on devrait tracer pour obtenir une évaluation visuelle de la nature des données et pour vérifier les estimations mathématiques. On peut calculer une CI_p grâce à la méthode d'*interpolation linéaire* sans hypothèses, au moyen d'un programme informatique appelé BOOTSTRP (Norberg-King, 1988; EPA, 1989; *cf.* annexe B). On pourrait aussi calculer la CI_p pour l'accroissement de la biomasse totale, c'est-à-dire en utilisant des données tenant compte tant de la biomasse que de la mortalité. L'usage de la CI_p se répand de plus en plus à l'heure actuelle.

que la durée d'exposition ne représente que 1 ou 2 % de la vie de la tête-de-boule et qu'on ne peut donc la qualifier de chronique. On emploie parfois aussi le terme «seuil de toxicité subchronique» (*subchronic value*), qui peut être utilisé à bon droit. Cette valeur calculée pourrait aussi être appelée *concentration seuil d'effet*, ou CSE, le terme «seuil» prenant ici le sens de «point auquel commence un effet».

On peut utiliser comme résultat de remplacement ou additionnel un paramètre qui est de plus en plus utilisé, la CI_p (*concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné*). Il s'agit d'une estimation ponctuelle de la concentration causant un certain degré d'effet. Le pourcentage de réduction de la croissance ou d'augmentation de la mortalité par rapport aux poissons témoins est sélectionné par l'expérimentateur; il est en général de 20 ou 25 %. La CI_p est une mesure utile de l'effet, souvent plus sensible et plus souhaitable que les CSEO/CMEO déterminées par vérification d'hypothèses (Suter *et al.*, 1987). En particulier, on peut calculer des limites de confiance, ce qui permet de procéder à une comparaison statistique des diverses valeurs de cette variable. Pour entreprendre une analyse de cette nature, on pourrait commencer par tracer le graphique de la réduction de la croissance, en pourcentage, par rapport au logarithme de la concentration d'essai, et on pourrait lire la CI_{20} ou la CI_{25} sur ce graphique. Celui-ci permettrait aussi de vérifier les résultats obtenus par des opérations mathématiques. Une méthode simple d'*interpolation linéaire* conduit à l'obtention d'une estimation mathématique de la CI_p (EPA, 1989, annexe J). La CI_p et ses limites de confiance peuvent être calculées au moyen d'un programme informatique appelé BOOTSTRP (Norberg-King, 1988; EPA, 1989)[v]; on peut en obtenir une copie à jour en communiquant avec Environnement Canada (*cf.* annexe B).

On pourrait parfois calculer une CL_{50} dans les essais à concentrations multiples; il s'agirait d'une estimation ponctuelle souhaitable de la mortalité des larves. La CL_{50} porterait sur une période définie, normalement les sept jours d'exposition. L'intervalle des concentrations d'essai pourrait être élargi vers le haut pour qu'on soit sûr d'obtenir plus de 50 % de mortalité dans au moins une concentration, de sorte qu'on puisse estimer la CL_{50}. Plusieurs méthodes fiables existent pour calculer la CL_{50} et ses limites de confiance à 95 %; les spécialistes de la toxicologie aquatique les connaissent généralement bien (*cf.* annexe E).

Une autre méthode consiste à analyser la biomasse totale de chaque récipient et utilise tant le poids des larves que le nombre d'entre elles qui survivent[v]. Il s'agit d'une méthode puissante, que nous recommandons.

Lors d'un essai à concentration unique, un test t constitue normalement la méthode appropriée pour comparer les données obtenues dans la concentration d'essai à celles obtenues dans la solution de contrôle; la méthode d'application d'un test t peut être tirée de n'importe quel manuel de statistique. On considère qu'une substance à expérimenter a un effet lorsque la mortalité est significativement supérieure ou le poids significativement inférieur chez les sujets soumis à l'essai à ce qu'ils sont chez les sujets témoins. Les exigences relatives à l'homogénéité de la variance et à la normalité des données (EPA, 1989, annexe H; Gulley *et al.*, 1989) doivent être respectées avant que le test t standard ne soit appliqué. Lorsque les données ne sont pas conformes à ces exigences, on pourrait choisir un test non paramétrique après consultation d'un statisticien; à ce jour, il

n'existe aucun test particulier qui puisse être considéré comme étant d'usage courant.

Dans certains cas, les groupes d'essais pourraient ne pas correspondre à différentes concentrations d'un même effluent ou d'un même produit chimique, mais plutôt représenter un ensemble d'échantillons différents, comme des effluents non dilués provenant de différentes installations industrielles ou encore des eaux de surface prélevées en différents endroits. On pourrait alors chercher à déterminer non seulement si chaque échantillon diffère des témoins, mais aussi si les échantillons diffèrent les uns des autres. Une option du programme statistique TOXSTAT[v] (test de Tukey) offre cette possibilité. Pour de pareils groupes d'essais, on ne devrait pas consigner les résultats de chacun des échantillons sous forme de CSEO/CMEO, mais plutôt calculer le rapport de la mortalité ou du poids des sujets soumis à l'essai et des sujets témoins; il faudrait aussi indiquer si la différence entre les deux valeurs est significative.

4.6 Produits toxiques de référence

L'utilisation courante de produits toxiques de référence est nécessaire à l'évaluation, dans des conditions d'essai normalisées, de la sensibilité relative des groupes de poissons utilisés ainsi que de la précision et de la fiabilité des données obtenues en laboratoire pour ces produits. La sensibilité des poissons aux produits toxiques de référence devrait être évaluée au moins une fois chaque mois qu'on utilise des larves pour des essais de toxicité.

Les critères appliqués au choix des produits toxiques de référence convenant à cet essai sont les suivants :

- facilité d'obtention du produit à l'état pur;
- durée de conservation prolongée (stabilité);
- solubilité élevée dans l'eau;
- stabilité en solution aqueuse;
- risque minimum pour l'utilisateur;
- facilité et précision de l'analyse;
- courbe dose-effet satisfaisante pour la tête-de-boule;
- incidence connue du pH sur la toxicité du produit chez la tête-de-boule;
- influence connue de la dureté de l'eau sur la toxicité du produit chez la tête-de-boule.

Pour cet essai, on recommande d'utiliser comme produits toxiques de référence un ou plusieurs des composés suivants de qualité «réactif» : chlorure de sodium, phénol ou zinc (préparé au moyen de sulfate de zinc). On devrait évaluer la sensibilité des poissons grâce à des essais normalisés selon les méthodes indiquées dans le présent document afin de déterminer la CSEO/CMEO ou encore la CI_p d'un ou plusieurs de ces produits chimiques. Pour les essais, il faudrait prendre l'eau de contrôle/de dilution habituellement utilisée au laboratoire ou encore une eau reconstituée modérément dure s'il faut un haut degré de normalisation[w]. Les conditions et les

---

w Étant donné que le pH, la dureté et d'autres caractéristiques de l'eau de dilution peuvent influencer nettement la toxicité de la substance à expérimenter, l'utilisation d'une eau reconstituée normalisée permet d'obtenir des résultats que l'on peut comparer de façon significative avec ceux d'autres laboratoires.

méthodes employées pour les essais de produits toxiques de référence doivent être uniformes et conformes au présent document.

Une carte de contrôle (Environnement Canada, 1990c) devrait être établie et mise à jour pour chaque produit toxique de référence utilisé. Les CSEO ou les CI_p successives sont portées sur cette carte; on les examine afin de savoir si les résultats s'inscrivent dans un intervalle de plus ou moins deux fois l'écart-type des valeurs obtenues lors des essais précédents. On recalcule la moyenne géométrique des CSEO ou des CI_p et ses limites de contrôle ($\pm$ 2 fois l'écart-type, selon une base géométrique [logarithmique]*) pour chaque CSEO ou CI_p successive jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EPA, 1989; Environnement Canada, 1990c).

Lorsqu'une CSEO ou une CI_p s'inscrit en dehors des limites de contrôle, la sensibilité des poissons et le système d'essai sont douteux. Dans la mesure où cela peut se produire 5 % du temps du fait du hasard seulement, une valeur qui s'inscrit en dehors de ces limites ne signifie pas nécessairement qu'il faille mettre en question la sensibilité de la population de poissons ou la précision des données de toxicité produites par le laboratoire; il s'agit plutôt d'un avertissement que cela pourrait être le cas. On doit alors vérifier toutes les conditions de détention et d'essai.

Le recours à des limites de contrôle n'indique pas nécessairement qu'un laboratoire produit des résultats constants. Un laboratoire qui produirait des résultats extrêmement variables pour un produit toxique de référence aurait des limites de contrôle très larges; un nouveau point de données pourrait se situer à l'intérieur des limites de contrôle, mais il n'en représenterait pas moins une variation non souhaitable des résultats obtenus dans les essais. Environnement Canada (1990c) suggère comme limite, à titre provisoire, un coefficient de variation de 20 ou 30 %. Cela paraît un intervalle raisonnable, car, au cours d'essais comparatifs menés dans la région de San Francisco, on a obtenu des coefficients de variation de 22 % (base logarithmique) et de 31 % (base arithmétique) (Anderson et Norberg-King, 1991). Cependant, pour établir une limite des variations admissibles des résultats obtenus lors d'essais sur des produits toxiques de référence, il faudrait accumuler davantage de données sur la reproductibilité que les laboratoires canadiens peuvent atteindre lors des essais de sept jours sur la tête-de-boule.

On recommande d'utiliser à cette fin de l'eau reconstituée douce, préparée en ajoutant les quantités suivantes de sels de qualité «réactif» à de l'eau désionisée et filtrée au charbon ou à de l'eau distillée au verre (ASTM, 1980) :

Sel	Formule	mg/L
Bicarbonate de sodium	$NaHCO_3$	48
Sulfate de calcium	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	30
Sulfate de magnésium	$MgSO_4$	30
Chlorure de potassium	KCl	2

L'eau reconstituée devrait être laissée au repos pendant plusieurs jours (EPA, 1985) et aérée intensément avant d'être utilisée. On peut s'attendre à ce que sa dureté totale soit de 40 à 48 mg/L et son pH de 7,4 $\pm$ 0,2.

* Lorsqu'on ne peut obtenir une distribution log-normale des CSEO ou des CI_p, il se peut qu'une moyenne arithmétique accompagnée d'un écart-type se révèle plus appropriée.

Les solutions mères de phénol devraient être préparées le jour même où elles sont utilisées. On devrait utiliser du sulfate de zinc (généralement de formule $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ et d'une masse moléculaire égale à 4,398 fois celle du zinc) pour la préparation des solutions mères de zinc, qui devraient être acides (pH de 3 à 4). Ces solutions peuvent être utilisées dès leur préparation ou être conservées à l'obscurité à une température de 4 ± 2 °C pendant plusieurs semaines jusqu'au moment de l'utilisation. Les concentrations de zinc devraient être exprimées en mg Zn^{++}/L. Les concentrations de chlorure de sodium devraient être exprimées en poids du sel total (NaCl) dans l'eau (g/L).

Les concentrations des produits toxiques de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (p. ex., APHA *et al.*, 1989). Au moment de la préparation des solutions d'essai, on devrait prélever des aliquotes au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à teneur supérieure, moyenne et inférieure; ces aliquotes devraient être analysées immédiatement ou stockées pour analyse future, au cas où la CSEO ou la CI_p serait atypique (à l'extérieur des limites de contrôle). Si elles sont stockées, on devrait les tenir à l'obscurité, à une température de 4 ± 2 °C. Les solutions de zinc et de phénol devraient être préservées avant d'être stockées (APHA *et al.*, 1989). Les aliquotes stockées nécessitant un dosage devraient être traitées sans délai aussitôt l'essai de toxicité terminé. Il est souhaitable de mesurer les concentrations dans les mêmes solutions à la fin de l'essai, une fois terminées les observations biologiques. Le calcul de la CSEO ou de la CI_p devrait être fondé sur les moyennes géométriques des concentrations mesurées, si ces moyennes diffèrent sensiblement (c.-à-d. de 20 % ou plus) des concentrations nominales et si les analyses chimiques sont exactes et fiables.

4.7 Considérations juridiques

On doit veiller à ce que les échantillons soumis à des essais soient recevables en preuve en cas de poursuites judiciaires. Pour cela, les échantillons doivent : être représentatifs de la substance échantillonnée; ne pas être contaminés par des substances étrangères; être identifiés avec précision (date, heure et lieu d'origine); être consignés clairement pour assurer la continuité de la preuve; et être analysés le plus tôt possible après leur prélèvement. Les personnes responsables de l'exécution de l'essai et de la rédaction du procès-verbal doivent assurer la continuité de la preuve en cas de procédures judiciaires (McCaffrey, 1979) ainsi que l'intégrité des résultats des essais.

Section 5

Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques

La présente section énonce des instructions particulières pour l'essai de produits chimiques, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4. Pour l'essai des produits chimiques, on procède généralement à un essai à concentrations multiples afin de déterminer la CSEO/CMEO ou la CI_p. Trois répétitions, le minimum requis pour l'analyse statistique des résultats, pourraient également être exigées en vertu de règlements pour l'homologation d'un pesticide ou d'un produit chimique appartenant à une catégorie similaire.

5.1 Propriétés, étiquetage et stockage des échantillons

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés du produit chimique à expérimenter, notamment sa solubilité dans l'eau, sa tension de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation et sa biodégradabilité. Il faudrait consulter la fiche technique sur la sécurité d'utilisation de ce produit, s'il en existe une. Lorsque la solubilité dans l'eau d'un produit chimique est douteuse, les méthodes admissibles utilisées antérieurement pour la préparation de solutions aqueuses de ce produit devraient être recueillies et consignées. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements existants, par exemple la formule structurelle, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés, la présence et les quantités d'additifs, et le coefficient de partage n-octanol:eau[x]. Il faudrait en outre disposer d'une méthode admissible de dosage du produit en solution aqueuse dans l'intervalle prévu des concentrations d'essai, ainsi que de données relatives à la précision et à l'exactitude des dosages.

Dès réception, les contenants doivent être fermés hermétiquement et codés ou étiquetés (p. ex., nom du produit, fournisseur et date de réception). Les conditions de stockage (p. ex., température et protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature du produit. Les modes opératoires normalisés pour la manipulation et le stockage des produits chimiques devraient être respectés.

5.2 Préparation des solutions d'essai

Pour préparer les solutions d'essai d'un produit chimique, on ajoute normalement des aliquotes d'une solution mère à de l'eau de contrôle/de dilution. Par ailleurs, pour les solutions très concentrées ou les grands volumes, on peut ajouter des quantités prépesées (à l'aide d'une balance de précision) du produit chimique dans de l'eau de contrôle/de dilution, de façon à obtenir les teneurs nominales à expérimenter. Si l'on utilise une solution mère, la concentration et la stabilité de la substance à expérimenter dans cette solution devraient être déterminées avant le commencement de l'essai. Les solutions mères qui sont sujettes

x La connaissance des propriétés du produit chimique aide à déterminer les précautions et exigences particulières requises pour sa manipulation et pour les essais (p. ex., essais dans des conditions spéciales d'aération, nécessité d'utiliser un solvant). L'information concernant la solubilité et la stabilité chimique en eau douce est également utile dans l'interprétation des résultats des essais.

à la photolyse devraient être placées à l'abri de la lumière, et les solutions instables doivent être préparées aussi souvent qu'il le faut pour maintenir toujours les mêmes concentrations dans les solutions d'essai.

Dans le cas des substances qui ne se dissolvent pas facilement dans l'eau, les solutions mères peuvent être préparées au moyen de la technique de la colonne génératrice (Billington *et al.*, 1988; Shiu *et al.*, 1988) ou, comme second choix, par dispersion ultrasonique. La dispersion ultrasonique peut produire des gouttelettes non uniformes et de tailles différentes, dont certaines pourraient migrer vers la surface du liquide, ou encore des gouttelettes n'ayant pas toutes la même biodisponibilité, ce qui pourrait créer des variations de la toxicité. On ne devrait pas utiliser de solvants, d'émulsifiants ou de dispersants organiques pour accroître la solubilité du produit chimique, sauf dans les cas où ces substances pourraient être incorporées avec ce produit dans des formulations commerciales d'usage normal. Le cas échéant, on devrait préparer une solution de contrôle supplémentaire renfermant la même concentration d'agent solubilisant que la solution la plus concentrée du produit chimique à expérimenter. Ces agents devraient être utilisés parcimonieusement : leur concentration ne devrait pas dépasser 0,1 mL/L dans toute solution d'essai. Lorsqu'on utilise des solvants, il est préférable d'utiliser les produits suivants (EPA, 1985) : diméthylformamide, triéthylèneglycol, méthanol, éthanol et acétone.

5.3 Eau de contrôle/de dilution

L'eau de contrôle/de dilution peut être de l'eau reconstituée, de l'eau douce dans laquelle les poissons adultes ont été élevés et les larves sont écloses (eau naturelle, souterraine ou de surface, ou eau municipale déchlorée en dernier recours)[e], ou un échantillon d'un milieu récepteur si une situation locale présente un intérêt particulier. Le choix de l'eau de contrôle/de dilution dépend de l'objet de l'essai.

Lorsqu'un haut degré de normalisation est nécessaire (p. ex., lorsqu'il faut calculer la toxicité d'un produit chimique dans plusieurs installations d'essai et comparer les valeurs obtenues), il faudrait préparer de l'eau reconstituée douce (d'une dureté de 40 à 48 mg/L et d'un pH de 7,2 à 7,5) et l'utiliser pour toutes les dilutions et comme eau de contrôle[w].

Lorsqu'on doit évaluer l'effet toxique d'un produit chimique sur un milieu récepteur particulier, on pourrait prélever des échantillons de ce milieu, à l'abri de l'influence du produit, et les utiliser comme eau de contrôle/de dilution[y,z,aa]. Par

---

y Les contaminants qui se trouvent déjà dans le milieu récepteur pourraient ajouter leur toxicité à celle du produit chimique ou de l'eau usée à expérimenter. Dans ce cas, de l'eau de contrôle/de dilution non contaminée (eau naturelle, eau reconstituée ou eau municipale déchlorée) donnerait une estimation plus exacte de la toxicité de la substance à expérimenter, mais pas nécessairement de son impact total sur le site visé.

Lorsque l'essai vise à déterminer l'effet d'une eau usée ou d'un produit chimique déterminé sur un milieu récepteur particulier, il importe peu que ce milieu modifie la toxicité de l'échantillon à cause de la présence d'autres contaminants ou, à l'inverse, de substances qui réduisent les effets toxiques, comme des acides humiques. En cas d'accroissement de la toxicité attribuable au milieu récepteur, il convient de soumettre à l'essai, au minimum, une deuxième solution de contrôle constituée de milieu d'élevage et, au maximum, une autre série de solutions à différentes concentrations en prenant le milieu d'élevage comme eau de dilution.

z Il serait souhaitable d'acclimater les poissons reproducteurs et de détenir les embryons dans le milieu récepteur avant d'utiliser les larves dans un essai où ce milieu récepteur sert d'eau de contrôle/de dilution, mais cela est rarement possible à cause de la nécessité de transporter des volumes d'eau considérables. Si les essais étaient

exemple, il peut s'agir d'évaluer l'effet toxique réel ou potentiel, sur une nappe d'eau particulière, de déversements ou d'applications intentionnelles de substances chimiques (p. ex., vaporisation d'un pesticide). On peut aussi se servir pour cela de l'eau naturelle du laboratoire, notamment lorsque le prélèvement et l'utilisation du milieu récepteur posent des problèmes pratiques. L'eau normale du laboratoire dans laquelle les poissons ont été élevés convient aussi en d'autres circonstances (p. ex., évaluation préliminaire ou intralaboratoire de la toxicité du produit chimique).

5.4 Observations et mesures

Outre les observations relatives à la toxicité prévues à la sous-section 4.4, il faut procéder à diverses observations et mesures au cours des essais de produits chimiques.

Pendant la préparation des solutions et à chacune des périodes d'observation prescrites, on devrait examiner chaque solution afin d'observer la présence et l'évolution du produit chimique (p. ex., odeur, couleur et opacité de la solution, précipitation ou floculation du produit chimique). Toute observation devrait être consignée.

Il est souhaitable et recommandé d'analyser les solutions d'essai afin de déterminer les concentrations du produit chimique auxquelles les poissons sont exposés[bb]. Pour ce faire, on devrait prélever des aliquotes dans les solutions d'essai à teneur supérieure, moyenne et inférieure et dans les solutions de contrôle. À tout le moins, il faudrait analyser séparément des échantillons prélevés au commencement et à la fin de l'intervalle de renouvellement, la première et la dernière journée de l'essai. Ces échantillons devraient être préservés, stockés et analysés au moyen des meilleures méthodes éprouvées dont on dispose pour établir la concentration du produit chimique visé en solution aqueuse.

Les analyses chimiques sont particulièrement recommandables si (EPA, 1985) : les solutions d'essai sont aérées; la substance à expérimenter précipite ou est volatile ou insoluble; on sait que cette substance est absorbée par les matériaux de fabrication des contenants d'essai; ou l'on utilise un système à renouvellement continu. Dans certains cas (p. ex., l'essai de pesticides en vue de leur homologation), il pourrait être obligatoire de mesurer les concentrations de produit chimique dans les solutions d'essai.

---

exécutés non loin du site visé, il pourrait être possible d'utiliser de l'eau du milieu récepteur dans les aquariums de reproduction pendant au moins cinq jours avant la sélection des embryons et de détenir ceux-ci dans cette eau jusqu'à l'éclosion des larves.

aa Une solution de rechange (ou un compromis) quant à l'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution consiste à ajuster le pH et la dureté de l'eau du laboratoire (ou d'une eau reconstituée) pour qu'ils correspondent à ceux du milieu récepteur. Selon le cas, l'ajustement peut se faire en fonction de moyennes saisonnières ou de valeurs mesurées dans le milieu récepteur à un moment particulier. L'ajustement peut être fait par les méthodes mentionnées à la division 2.3.4, y compris l'addition de quantités et de proportions appropriées de sels de qualité «réactif» (ASTM, 1980; ces renseignements figurent aussi au tableau 2 d'un rapport d'Environnement Canada (1990b)).

bb Il n'est pas nécessaire d'effectuer ces analyses dans tous les cas, en raison des limites de l'analyse, des coûts à engager ou de l'existence de données techniques antérieures indiquant la stabilité du produit chimique en solution dans des conditions analogues à celles de l'essai.

Si les mesures chimiques indiquent que les concentrations ont diminué de plus de 20% durant l'essai, on devrait évaluer à nouveau la toxicité du produit chimique au moyen d'un essai où les solutions sont renouvelées plus fréquemment qu'une fois par jour. Si nécessaire, on pourrait envisager d'effectuer un essai à renouvellement continu, mais il faudrait alors prévoir une conception spéciale en fonction de la faible taille des larves (McKim, 1985).

Dans tous les essais au cours desquels on mesure les concentrations, la toxicité devrait être calculée et exprimée en fonction des concentrations mesurées, sauf s'il y a de bons motifs de croire que les mesures chimiques ne sont pas exactes. Aux fins de ces calculs, on devrait caractériser chaque solution d'essai par la moyenne géométrique des concentrations mesurées auxquelles les organismes ont été exposés.

5.5 Résultats et calculs

Le résultat des essais de produits chimiques est habituellement une CSEO/CMEO ou une CI_p applicable à la croissance ou à la mortalité, c'est-à-dire un ou plusieurs des résultats de base décrits à la sous-section 4.5.

Si l'on utilise une solution de contrôle contenant un solvant, l'essai n'est pas valable si la mortalité dans cette solution (ou dans l'eau de contrôle non traitée) est supérieure à 20 %. L'essai est aussi invalidé si plus de 20 % des poissons dans l'une ou l'autre des solutions de contrôle ont un comportement atypique ou stressé tel qu'une nage irrégulière ou un manque d'équilibre (*cf.* 4.3, 4.4 et 4.5). Si, grâce au test de Dunnett (*cf.* 4.5[v]), on établit que la différence significative minimale des poids des poissons est supérieure à 25 % du poids moyen des poissons témoins, la validité et l'utilité des résultats devraient être mises en question.

Section 6

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats

La présente section énonce des instructions particulières pour le prélèvement, la préparation et l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats; ces instructions viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4.

6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les contenants utilisés pour le transport et le stockage des échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats doivent être fabriqués de matériaux non toxiques. On accordera la préférence aux contenants en verre ou revêtus de Teflon^{MC}, qui sont inertes et n'absorbent guère de produits chimiques. Les contenants de polyéthylène ou de polypropylène qui servent au transport d'eau potable sont moins intéressants, mais ils peuvent aussi être utilisés. Les contenants doivent être neufs, ou encore nettoyés à fond et rincés avec de l'eau non contaminée; ils devraient également être rincés avec l'échantillon à recueillir. Il faudrait les remplir de manière à réduire les vides d'air.

La plupart des essais sur des effluents, des élutriats et des lixiviats ne sont pas faits sur place, mais dans un laboratoire à milieu contrôlé. Le prélèvement des échantillons d'effluents ou de lixiviats devrait alors se faire à trois occasions distinctes, à intervalles de deux ou trois jours. Le premier prélèvement devrait fournir des échantillons frais pour les premier et deuxième jours de l'essai, le deuxième prélèvement pour les troisième et quatrième jours, et le troisième prélèvement pour les cinquième, sixième et septième jours. Lorsque c'est possible, on devrait aussi préparer des aliquotes fraîches des échantillons d'élutriats et les livrer au laboratoire conformément à ce calendrier. Il n'est pas souhaitable de stocker les échantillons d'élutriats pendant sept jours avant de les utiliser parce qu'ils pourraient ne pas être stables pendant toute cette période. Lorsque les essais sur des échantillons d'effluents ou de lixiviats sont faits dans des laboratoires sur place, des échantillons devraient être recueillis tous les jours et utilisés dans un délai de 24 h pour le renouvellement des solutions d'essai (EPA, 1989).

Un échantillon de 4 L suffit pour exécuter, à l'extérieur, un essai à concentrations multiples (p. ex., à 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,2 et 1,6 %) et les analyses courantes des échantillons. Il en faut moins pour les essais qui portent sur une concentration unique (*cf.* 4.5). Au moment du prélèvement, chaque contenant doit être rempli, fermé hermétiquement et étiqueté ou codé. Les renseignements qui doivent figurer sur l'étiquette comprennent au moins le type et la source de l'échantillon, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom du préposé à l'échantillonnage. Les échantillons reçus par le laboratoire dans des contenants non étiquetés ou non codés ne devraient pas être retenus pour les essais. Il en est de même pour ceux reçus dans des contenants partiellement remplis, car les substances toxiques volatiles peuvent alors s'échapper dans le vide d'air. Par ailleurs, lorsqu'on sait que la volatilité ne pose pas de problème, ces

échantillons pourraient faire l'objet d'essais, à la discrétion de l'expérimentateur.

L'essai des échantillons d'effluents et de lixiviats devrait être entrepris le plus tôt possible après leur prélèvement. Chaque fois que possible, les essais devraient démarrer moins de 24 h et ils doivent démarrer moins de 72 h après le prélèvement des échantillons. Les échantillons prélevés pour extraction et essai de l'élutriat devraient aussi faire l'objet d'un essai le plus tôt possible, dans les dix jours suivant leur réception. L'essai des élutriats devrait commencer moins de 72 h après leur préparation ou dans les délais indiqués dans le règlement ou le protocole expérimental pertinent.

Tous les échantillons d'effluents ou de lixiviats devraient être gardés au frais (de 1 à 7 °C, de préférence à 4 ±2 °C) pendant le transport et le stockage. Au moment du prélèvement, les échantillons chauds (plus de 7 °C) devraient être ramenés entre 1 et 7 °C avec de la glace ou des sacs réfrigérants. Au besoin, il faudrait utiliser de ces sacs ou d'autres moyens de réfrigération pour s'assurer que la température des échantillons demeure entre 1 et 7 °C durant le transport. Les échantillons ne doivent pas geler pendant le transport.

À l'arrivée au laboratoire, l'aliquote d'effluent ou de lixiviat requise à ce moment peut être ramenée immédiatement ou au cours de la nuit à 25 °C en vue de l'essai. Les aliquotes restantes qui sont destinées au renouvellement des solutions devraient être conservées à l'obscurité dans des contenants hermétiques et à une température comprise entre 1 et 7 °C, de préférence à 4 ± 2 °C.

Sauf indication contraire, la température pendant le transport et le stockage des élutriats ainsi que des échantillons destinés à l'extraction aqueuse et à l'essai ultérieur de l'élutriat devrait être conforme aux indications ci-dessus.

6.2 Préparation des solutions d'essai

Les contenants d'échantillons doivent être agités vigoureusement juste avant d'être vidés afin d'assurer la resuspension des solides décantables. Les sous-échantillons (c.-à-d. les échantillons répartis dans deux ou plusieurs contenants) doivent être mélangés ensemble afin d'assurer leur homogénéité. S'il est nécessaire de poursuivre le stockage, l'échantillon composite (ou une partie de cet échantillon) doit être retourné dans les contenants de sous-échantillons et stocké (*cf.* 6.1) jusqu'au moment de l'utilisation.

Les échantillons susceptibles de contenir de petits organismes qui pourraient concurrencer ou attaquer les larves de tête-de-boule devraient être filtrés sur un filet à plancton à mailles de 60 µm avant d'être utilisés (EPA, 1989). Le filtrage d'un échantillon pourrait causer l'extraction de matières décantables ou en suspension qui sont représentatives de l'échantillon et qui pourraient accroître en partie ou modifier sa toxicité. Lorsqu'on craint que cela se produise, on devrait faire un second essai en parallèle avec une portion non filtrée de l'échantillon.

6.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour les essais de conformité réalisés sur des échantillons d'effluents ou de lixiviats, on devrait utiliser comme eau de contrôle/de dilution l'eau du laboratoire normalement utilisée pour les poissons ou un échantillon de milieu récepteur. Étant donné que les résultats pourraient varier selon la source d'eau employée, on doit fixer les objectifs de l'essai avant d'effectuer ce choix. Il faudrait

également tenir compte des difficultés et des coûts liés au transport, car l'utilisation de milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution augmente considérablement les quantités d'eau à transporter.

L'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution pourrait être souhaitable dans certains cas, lorsqu'il faut recueillir des renseignements propres au site visé concernant l'effet toxique potentiel d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un élutriat sur un milieu récepteur particulier[y,z,aa]. Un bon exemple serait un essai en vue de détecter un effet sublétal en périphérie d'une zone de mélange, compte tenu d'exigences réglementaires propres à un lieu donné. Les conditions de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la sous-section 6.1. On devrait filtrer les eaux de surface pour éliminer les organismes, comme le prévoit la sous-section 6.2.

Si un échantillon de milieu récepteur prélevé en amont doit être utilisé comme eau de contrôle/de dilution, une solution de contrôle distincte devrait être préparée au moyen de l'eau du laboratoire utilisée pour les poissons. La croissance, la mortalité et le comportement de nage des poissons (*cf.* 4.5) dans la solution de contrôle d'eau du laboratoire devraient être comparés à ceux des poissons dans l'échantillon de milieu récepteur.

Pour les essais qui nécessitent un haut degré de normalisation, on peut faire appel à de l'eau reconstituée comme eau de contrôle/de dilution[w]. Il convient notamment de le faire lorsqu'il est souhaitable de minimiser toute variation attribuable à des différences dans la chimie de l'eau de dilution. Ce peut être le cas si l'on mène des études visant à établir un lien entre des données de toxicité concernant différents types ou sources d'effluents, de lixiviats ou d'élutriats, lorsque ces données sont produites par divers établissements ou qu'elles le sont par un seul établissement où la qualité de l'eau est variable.

6.4 Conditions de l'essai

Normalement, les échantillons d'effluents, de lixiviats ou d'élutriats ne sont ni filtrés ni agités durant les essais. Cependant, la présence en forte concentration de matières solides inorganiques ou organiques en suspension dans un échantillon pourrait être particulièrement stressante pour les larves de poissons et peut avoir un effet létal aigu même chez de jeunes poissons, si les concentrations sont assez élevées (p. ex., 2 000 mg/L et plus, Noggle, 1978; McLeay *et al.*, 1987; Servizi *et al.*, 1987; Hall et Hall, 1989). En outre, des concentrations élevées de matières biologiques dans certains types d'effluents traités pourraient ajouter à la toxicité des échantillons à cause de la production d'ammoniac ou de nitrites (Servizi et Gordon, 1986). On peut procéder à un essai additionnel lorsqu'on craint un accroissement de la toxicité par suite de la présence en concentration élevée de matières décantables ou en suspension dans les échantillons d'effluents, d'élutriats ou de lixiviats et lorsque la recherche a pour objet de quantifier la toxicité attribuable aux matières contenues dans les échantillons. Pour ce second essai, on devrait utiliser une partie de l'échantillon traitée par filtrage ou par décantation afin d'éliminer les matières solides, mais la démarche adoptée devrait être identique par ailleurs.

6.5 *Observations et mesures*

On devrait observer la mortalité et le comportement de nage des poissons à intervalles de 24 h et mesurer leur poids sec à la fin de l'essai de sept jours, conformément à la sous-section 4.4.

La couleur, la turbidité, l'odeur et l'homogénéité (c.-à-d. la présence de matières flottables ou de solides décantables) de l'échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat devraient être observées au moment de la préparation des solutions d'essai. La précipitation, la floculation, le changement de couleur, l'odeur ou d'autres réactions au moment de la dilution avec l'eau devraient être consignés, comme tous les changements d'aspect des solutions pendant l'essai (p. ex., le moussage, la décantation, la floculation, l'augmentation ou la diminution de la turbidité et les variations de couleur).

Pour les essais portant sur des solutions fortement colorées ou opaques ou sur des échantillons produisant de la mousse dans le récipient d'essai, on devrait utiliser les contenants à fond grillagé mentionnés à la sous-section 3.3 et à la division 4.3.4. On devrait inspecter les poissons en soulevant le contenant dans son récipient de solution d'essai jusqu'à ce qu'on puisse les voir. Au besoin, on pourrait le transférer brièvement dans un récipient d'eau de dilution limpide pour y faire les observations sur la mortalité et sur le comportement de nage aberrant. L'expérience montre que la brève période de transfert et d'immersion dans un liquide «propre» n'endommage aucunement les poissons et n'affecte pas de manière appréciable les résultats de l'essai de toxicité (Parrott, 1988).

Lorsque les échantillons d'effluent ont une teneur appréciable en matières solides, il est souhaitable de mesurer leur teneur totale en matières en suspension et en matières décantables (APHA *et al.*, 1989) dès leur réception; ces renseignements, qui font partie de la description générale de l'effluent et des caractéristiques des échantillons, pourraient influer sur les résultats de l'essai de toxicité.

6.6 *Résultats et calculs*

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur trois aliquotes de l'échantillon non dilué et sur trois aliquotes d'une solution de contrôle. Selon les exigences réglementaires précisées, les essais de conformité pourraient porter sur une seule concentration (100 % d'eaux usées, sauf indication contraire); ils pourraient permettre de déterminer la CSEO/CMEO ou la CI_p, ou encore de calculer la CL_{50} après sept jours ou une autre durée d'exposition, lorsqu'il y a une forte mortalité (*cf.* 4.5).

Les essais de toxicité réalisés à d'autres fins (p. ex., la détermination de sources de toxicité à l'intérieur d'une usine, de l'efficacité d'un traitement ou des effets de la modification de procédés sur la toxicité des effluents) pourraient, selon les objectifs de l'étude, porter sur une seule concentration (effluent à 100 % ou à une dilution appropriée, ainsi qu'un contrôle) ou sur des concentrations multiples. Les essais à concentration unique sont souvent un moyen économique d'établir la présence ou l'absence d'une toxicité mesurable ou de faire une évaluation préliminaire d'un nombre important d'échantillons afin d'établir leur toxicité relative. Les résultats de ces essais dépendent toujours des objectifs de l'étude, mais il pourrait s'agir, notamment, de cotes arbitraires de réussite ou d'échec ou d'un pourcentage de mortalité

après une période appropriée, par exemple sept jours. Les indications fournies à la sous-section 4.5 s'appliquent ici pour ce qui est de l'analyse statistique et du compte rendu des résultats d'un ensemble d'essais sur différents échantillons dont chacun est soumis à l'essai à une concentration seulement.

Section 7

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs

Le lecteur trouvera ci-après des instructions pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4.

7.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les méthodes de prélèvement, d'étiquetage, de transport et de stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la sous-section 6.1. Les essais devraient être mis en route le plus tôt possible après le prélèvement des échantillons, de préférence moins de 24 h et pas plus de 72 h après l'échantillonnage.

7.2 Préparation des solutions d'essai

Les contenants devraient être agités avant d'être vidés, afin d'assurer l'homogénéité des échantillons. Les sous-échantillons devraient être composés comme le prévoit la sous-section 6.2.

Les échantillons pouvant contenir des prédateurs ou des concurrents des larves de tête-de-boule devraient être filtrés sur un filet à plancton à mailles de 60 µm avant d'être utilisés, et on pourrait faire un second essai (avec échantillon non filtré) si l'on pensait que le filtrage peut modifier la toxicité de l'échantillon, comme on l'a mentionné à la sous-section 6.2.

7.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour les échantillons de milieux récepteurs prélevés au voisinage d'un point de rejet d'eaux usées, d'un déversement de substances chimiques ou d'une autre source ponctuelle de contamination possible, on peut prélever simultanément de l'eau en amont et l'utiliser comme eau de contrôle/de dilution pour les échantillons d'aval[2,aa]. Cette eau devrait être prélevée le plus près possible des sources de contamination en cause, mais en amont ou à l'extérieur de leur zone d'influence, et on devrait la filtrer afin d'en extraire les organismes, comme le prévoit la sous-section 6.2.

Si l'on utilise de l'eau d'amont comme eau de contrôle/de dilution, on devrait préparer une solution de contrôle distincte à partir de l'eau du laboratoire qu'on utilise normalement pour les poissons. Les conditions d'essai ainsi que les méthodes de préparation et d'évaluation de chacune des solutions de contrôle devraient être identiques et conformes aux dispositions des sous-sections 4.1 et 5.3.

Des contraintes logistiques, les effets toxiques prévus ou d'autres détails pratiques propres à l'emplacement pourraient empêcher l'utilisation d'eau d'amont comme eau de contrôle/de dilution. En pareil cas, il y aurait lieu d'utiliser l'eau du laboratoire servant à l'élevage des poissons comme eau de contrôle et pour toutes les dilutions. On pourrait ajuster ses caractéristiques de façon à simuler en partie le milieu récepteur en amont[aa].

7.4 Observations et mesures

La couleur, la turbidité, le moussage, la précipitation et les autres caractéristiques de l'échantillon et des solutions devraient être observés conformément aux dispositions de la sous-section 6.5, aussi bien pendant la préparation des solutions d'essai que pendant les essais eux-mêmes. Ces observations viennent s'ajouter aux observations de base sur les poissons prévues à la sous-section 4.4.

7.5 Résultats et calculs

Les résultats des essais portant sur des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux options et aux démarches prévues dans les sous-sections 4.5 et 6.6. Les résultats seraient normalement les mêmes que ceux mentionnés à la section 4.5, c'est-à-dire la mortalité, la croissance et le comportement de nage des larves de poisson.

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur trois aliquotes de l'échantillon non dilué et sur trois aliquotes d'une solution de contrôle. Lorsque les échantillons de milieux récepteurs sont probablement toxiques et qu'on souhaite obtenir des renseignements sur le degré de dilution nécessaire pour permettre une croissance et un développement normaux des larves de poissons, on devrait effectuer un essai complet en vue de déterminer la CSEO/CMEO ou la CI_p, conformément à la section 4, avec au moins une concentration non diluée (échantillon à 100 %) comme concentration la plus élevée soumise à l'essai.

Certains ensembles d'essais pourraient porter sur une série d'échantillons, comme des eaux de surface provenant d'un certain nombre d'emplacements, chaque échantillon étant soumis à l'essai sans être dilué. Les calculs statistiques et la présentation des résultats de ces essais devraient être conformes aux exigences de la sous-section 4.5.

Section 8

Procès-verbal de l'essai

Le procès-verbal de l'essai devrait décrire les substances et les méthodes utilisées ainsi que les résultats de l'essai. À partir de ce document, le lecteur devrait être en mesure de savoir si les conditions et les méthodes utilisées rendent les résultats admissibles pour l'utilisation prévue.

On peut citer les méthodes et conditions qui sont communes à une série continue d'essais (p. ex., essais de toxicité courants à des fins de surveillance ou de conformité) et qui sont conformes aux dispositions du présent document; on peut aussi présenter, en annexe, un rapport général définissant le mode opératoire normalisé. Dans les cas où des choix sont possibles, la démarche retenue devrait être précisée. Le rapport général devrait faire état des renseignements méthodologiques énumérés aux sections 8.2 à 8.6. Un rapport particulier énonçant les résultats de l'essai devrait renfermer les renseignements indiqués dans les sections 8.1 et 8.7. Des programmes de surveillance particuliers pourraient exiger la mention de certains éléments d'information dans le procès-verbal de l'essai (p. ex., le mode opératoire et les résultats des essais exigeant un ajustement du pH ou une modification de l'aération ou de l'oxygénation des solutions). Les autres détails concernant la réalisation et les résultats de l'essai qui ne sont pas consignés dans les rapports devraient être versés aux dossiers du laboratoire d'essai, de sorte qu'on puisse obtenir les renseignements voulus si une vérification de l'essai s'avère nécessaire.

8.1 Substance à expérimenter

- Type, source et description de l'échantillon (produit chimique, effluent, élutriat, lixiviat ou milieu récepteur; lieu et méthode de prélèvement; détails sur la nature, l'aspect et les propriétés de l'échantillon, ainsi que son volume ou son poids).

- Renseignements sur l'étiquetage ou le codage de la substance à expérimenter.

- Détails sur les modalités de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons (p. ex., échantillon instantané, discontinu ou composite, description du contenant et température de l'échantillon à la réception et pendant le stockage).

- Identité des personnes ayant prélevé ou fourni l'échantillon.

- Date et heure du prélèvement de l'échantillon, de sa réception à l'installation d'essai et du début de l'essai définitif.

8.2 Organismes soumis à l'essai

- Espèce et source.

- Description des conditions d'élevage et de reproduction : installations, éclairage, source et qualité de l'eau, prétraitement de l'eau, fréquence et mode de renouvellement de l'eau, densité des poissons dans les aquariums d'élevage et de reproduction, températures dans ces

aquariums, type de nourriture, ration et fréquence d'alimentation, incidence et traitement des maladies.

- Pourcentage hebdomadaire de mortalité chez les poissons élevés jusqu'à maturité et chez les poissons reproducteurs.

- Pour les embryons en élevage, taux approximatif de succès de l'éclosion. Pour les larves élevées, mortalité approximative à partir de l'éclosion jusqu'à l'âge de 30 jours.

8.3 Installations et appareillage

- Nom et adresse du laboratoire d'essai.

- Nom des personnes ayant effectué l'essai.

- Description des systèmes de réglage de l'éclairage et de la température dans l'installation d'essai.

- Description des récipients d'essai et des couvercles (taille, forme et type de matériau).

8.4 Eau de contrôle/de dilution

- Type(s) et source(s) de l'eau utilisée comme eau de contrôle/de dilution.

- Type et quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau de contrôle/de dilution.

- Détails sur l'échantillonnage et le stockage de l'eau de contrôle/de dilution, si elle provient du milieu récepteur en amont.

- Détails sur le prétraitement de l'eau : ajustement de la température, dégazage, débit et durée d'aération, etc.

- Variables de la qualité de l'eau (*cf.* 2.3.4) mesurées avant l'essai et au début de l'essai.

8.5 Méthode d'essai

- Brève mention de la méthode utilisée, s'il s'agit d'une méthode normalisée (p. ex., conforme au présent document).

- Conception et description de la méthode, si elle est spécialisée (p. ex., renouvellement continu ou à intervalles autres que quotidiens des solutions d'essai), ou si l'on apporte des modifications à une méthode normalisée.

- Méthode utilisée pour la préparation des solutions mères et des solutions d'essai de produits chimiques.

- Résultats de toute analyse chimique des solutions d'essai et mention des méthodes analytiques utilisées.

- Utilisation d'un essai préalable ou de détermination de l'ordre de grandeur.

- Fréquence et nature des observations effectuées pendant l'essai.

8.6 Conditions de l'essai

- Nombre, concentration, volume et profondeur des solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle.

- Nombre d'organismes par solution d'essai.

- Photopériode, source lumineuse et éclairement à la surface des solutions d'essai.

- Renseignements sur l'aération des solutions d'essai avant et pendant

l'exposition des poissons (le cas échéant, débit, durée et mode d'application).

- Description de toute solution ayant fait l'objet d'un ajustement du pH ou d'un filtrage, y compris la méthode employée.

- Résultats de toute mesure chimique des solutions d'essai (p. ex., concentration du produit chimique à expérimenter ou teneur en solides en suspension).

- Température, pH, oxygène dissous (mg/L et pourcentage de saturation) et conductivité, d'après les mesures faites dans chaque solution d'essai; dureté totale de l'eau de contrôle/de dilution et de la solution de la plus forte concentration au commencement de l'essai.

- Conditions et méthodes de mesure de la CSEO/CMEO ou de la CI_p pour le ou les produits de référence.

8.7 Résultats de l'essai

- Aspect des solutions d'essai et modifications constatées pendant l'essai.

- Comportement de nage et mortalité (nombre et pourcentage) des poissons dans chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle), selon les données recueillies à chaque période d'observation et à la fin de l'essai. Nombre et pourcentage de poissons témoins ayant manifestement un comportement de nage atypique.

- Résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur (s'il y en a eu un).

- CSEO/CMEO ou CI_p relatives à la croissance des larves et à la mortalité; différence significative minimale des poids moyens, et poids des poissons témoins; tests statistiques utilisés, et toute transformation nécessaire des données.

- Toute valeur CL_{50} (et ses limites de confiance à 95 %) qui a été établie, y compris une mention de la méthode statistique utilisée pour les calculs.

- Résultats des essais de toxicité faits avec le ou les produits toxiques de référence pendant le mois de l'essai, et moyenne géométrique (± 2 fois l'écart-type) des résultats obtenus avec le ou les mêmes produits lors d'essais antérieurs faits dans l'installation d'essai.

Références

Abernethy, S.G. et G.F. Westlake. «Guidelines for pH Adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing». ISBN 0-7729-5947-1. Rexdale (Ont.), ministère de l'Environnement de l'Ontario, 1989. 11 p.

Amlacher, E. «Textbook of Fish Diseases». ISBN 0-87666-037-5. Neptune City, NJ, T.F.H. Publications, 1970. 302 p.

Anderson, S.L. et T.J. Norberg-King. «Letter to the Editor. Precision of Short-term Chronic Toxicity Tests in the Real World». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 10, 1991, p. 143-145.

Andrews, A.K. et S.A. Flickinger. «Spawning Requirements and Characteristics of the Fathead Minnow». *Proceedings of the 27th Annual Conference, Southeastern Association of Game and Fish Commissioners*, 1973, p. 759-766.

APHA, AWWA et WPCF. «Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms». *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed. Washington, DC, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 1989. Part 8000, p. 8-1 - 8-143.

API [American Petroleum Institute]. «Fathead Minnow 7-day Test: Round Robin Study. Intra- and Interlaboratory Study to Determine the Reproducibility of the Seven-day Fathead Minnow Larval Survival and Growth Test». API Pub. No. 4468. Washington, DC, American Petroleum Institute, Health and Environmental Science Department, 1988.

Armstrong, F.A.J. et D.P. Scott. «Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 31, 1974, p. 1881-1885.

Arthur, J.W. et J.G. Eaton. «Chloramine Toxicity to the Amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 28, 1971, p. 1841-1845.

ASTM [American Society for Testing and Materials]. «Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians». Report E729-80. Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, 1980. 25 p.

ASTM. «Standard Practice for Using Brine Shrimp Nauplii as Food for Test Animals in Aquatic Toxicology». *Annual Book of ASTM Standards*, 1989, Section 11 (Water and Environmental Technology), E-1203, p. 796-800.

Battelle. «Standard Operating Procedure. Static-renewal Short-term Chronic Toxicity Tests with Fathead Minnows (*Pimephales promelas*)». Manuscript EEF-E-19-01. Columbus, OH, Battelle, Columbus Division, 1987. 10 p.

Benoit, D.A. et R.W. Carlson. «Spawning Success of Fathead Minnows on Selected Artificial Substrates». *Progressive Fish-culturist*, vol. 39, nº 2, 1977, p. 67-69.

Billington, J.W., G.-L. Huang, F. Szeto, W.Y. Shiu et D. MacKay. «Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single-component Systems». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, 1988, p. 117-124.

Birge, W.J., J.A. Black, T.M. Short et A.G. Westerman. «A Comparative Ecological and Toxicological Investigation of a Secondary Wastewater Treatment Plant Effluent and its Receiving Stream». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 8, 1989, p. 437-450.

Bouck, G.R. «Gasometer: An Inexpensive Device for Continuous Monitoring of Dissolved Gases and Supersaturation». *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 111, 1982, p. 505-516.

Brauhn, J.L., R.A. Schoettger et L.H. Mueller. «Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow Trout, Fathead Minnows, Channel Catfish, and Bluegills». EPA-660/3-75-011. Corvallis, OR, Environmental Protection Agency, 1975. 45 p.

Brown, E.E. et R.B. Gratzek (éd.). «Fish Farming Handbook: Food, Bait, Tropicals and Goldfish». ISBN 0-87055-341-0. Westport, CT, AVI Publishing Co. Inc., 1980. 31 p.

Brungs, W.A. «Chronic Effects of Low Dissolved Oxygen Concentrations on the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 28, 1971, p. 1119-1123. (1971a)

Brungs, W.A. «Chronic Effects of Constant Elevated Temperature on the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)». *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 100, 1971, p. 659-664. (1971b)

Brungs, W.A. «Effects of Residual Chlorine on Aquatic Life». *Journal of the Water Pollution Control Federation*, vol. 45, 1973, p. 2180-2193.

CCMRE [Conseil canadien des ministres des Ressources et de l'Environnement]. «Recommandations pour la qualité des eaux au Canada». Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1987.

Denny, J.S. «Guidelines for the Culture of Fathead Minnows *Pimephales promelas* for Use in Toxicity Tests». Report EPA/600/3-87/001. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, 1987. 42 p.

Doudoroff, P. et D.L. Shumway. «Dissolved Oxygen Requirements of Freshwater Fishes». Fisheries Technical Paper 86. Rome (Italie), Organistion des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, 1970. 291 p.

Environnement Canada. «Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel». Rapport SPE 1/RM/9. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990. 51 p. (1990a)

Environnement Canada. «Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp.». Rapport SPE 1/RM/11.

Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990. 57 p. (1990b)

Environnement Canada. «Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence». Rapport 1/RM/12. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990. 85 p. (1990c)

EPA [Environmental Protection Agency]. «Quality Criteria for Water». Washington, DC, Environmental Protection Agency, Office of Water and Hazardous Materials, 1976. 256 p.

EPA. «Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. Standard Evaluation Procedure». Report EPA-540/9-85-006. Washington, DC, Environmental Protection Agency, Hazard Evaluation Division, 1985. 12 p.

EPA. «Culturing of Fathead Minnows *Pimephales promelas*. Fathead Minnow Larval Survival and Growth Toxicity Test». Bandes vidéo non numérotées. Washington, DC, Environmental Protection Agency, Office of Water Protection and Permits, 1988.

EPA. «Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms», 2nd ed. Report EPA/600/4-89/001, préparé par C.I. Weber, W.H. Peltier, R.J. Norberg-King, W.B. Horning, F.A. Kessler, J.R. Menkedick, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, D.J. Klemm, W.H. Pickering, E.L. Robinson, J. Lazorchak, L.J. Wymer et R.W. Freyberg. Cincinnati, OH, Environmental Protection Agency, 1989. 248 p.

Gulley, D.D., A.M. Boelter et H.L. Bergman. «TOXSTAT Release 3.0». Laramie, WY, University of Wyoming, 1989. 18 p. et disquette d'ordinateur. [Adresse postale : Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming, Laramie, WY 82071, U.S.A. Téléphone : (307) 745-8504]

Hall, W.S. et L.W. Hall. «Toxicity of Alum Sludge to *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 42, nº 5, 1989, p. 791-798.

Hamilton, M.A., R.C. Russo et R.V. Thurston. «Trimmed Spearman-Karber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays». *Environmental Science and Technology*, vol. 11, 1977, p. 714-719.

Hubert, J.J. «PROBIT2: A Microcomputer Program for Probit Analysis». Guelph (Ont.), University of Guelph, Department of Mathematics and Statistics, 1987.

Korver, R.M. et J.B. Sprague. «Zinc Avoidance by Fathead Minnows (*Pimephales promelas*): Computerized Tracking and Greater Ecological Relevance». *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, vol. 46, 1989, p. 494-502.

Litchfield, J.T. «A Method for Rapid Graphic Solution of Time-percent Effect Curves». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 97, 1949, p. 399-408.

Lloyd, R. «Factors that Affect the Tolerance of Fish to Heavy Metal Poisoning».

Biological Problems in Water Pollution, Third Seminar, 1962. Publ. 999-WP-25. Washington, DC, U.S. Public Health Service, 1965, p. 181-187.

Masters, J.A., M.A. Lewis, D.H. Davidson et R.D. Bruce. «Validation of a Four-day *Ceriodaphnia* Toxicity Test and Statistical Considerations in Data Analysis». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 10, 1991, p. 47-55.

McCaffrey, L. «The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14 (1)(a) of the *Environmental Protection Act, 1971* and Section 32 (1) of the *Ontario Water Resources Act*». *Proceedings of the Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Hamilton, Ontario, November 7-9, 1978*. Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer nº 862. Ottawa, Pêches et Environnement Canada, 1979, p. 15-22.

McCormick, J.H., K.H. Jensen et L.E. Anderson. «Chronic Effects of Low pH and Elevated Aluminum on Survival, Maturation, Spawning and Embryo-larval Development of the Fathead Minnow in Soft Water». *Water, Air and Soil Pollution*, vol. 43, 1989, p. 293-307.

McKim, J.M. «Early Life Stage Toxicity Tests». *Fundamentals of Aquatic Toxicology, Methods and Applications*. G.M. Rand et S.R. Petrocelli (éd.). Washington, DC, Hemisphere Pub. Corp., 1985, p. 58-95.

McLeay, D.J., I.K. Birtwell, G.F. Hartman et G.L. Ennis. «Responses of Arctic Grayling (*Thymallus arcticus*) to Acute and Prolonged Exposure to Yukon Placer Mining Effluent». *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, vol. 44, 1987, p. 658-673.

Mount D.I. «Chronic Effect by Low pH on Fathead Minnow Survival, Growth and Reproduction». *Water Research*, vol. 7, 1973, p. 987-993.

Mount, D.I. et L. Anderson-Carnahan. «Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures». Report EPA-600/3-88/034. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, 1988.

Mount, D.I. et C.E. Stephan. «A Method for Establishing Acceptable Toxicant Limits for Fish — Malathion and Butoxyethanol Ester of 2,4-D». *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 96, 1967, p. 185-193.

NAS/NAE [National Academy of Sciences/National Academy of Engineering]. «Water Quality Criteria, 1972». EPA R3.033. Washington, DC, Environmental Protection Agency, 594 p.

Neville, C.M. «Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) Larval Growth Test». Rapport inédit. Rexdale (Ont.), ministère de l'Environnement de l'Ontario, 1989. 26 p.

NJ [New Jersey]. «Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) Larval Survival and Growth Test». *Interim Chronic Toxicity Testing Methodologies for Use in the NPDES Permit Program*. Trenton, NJ, State of New Jersey Department of Environmental Protection, 1989.

Noggle, C. «The Behavioral and Physiological Effects of Suspended

Sediment on Juvenile Salmonids» *Proceedings of the Fourth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Vancouver, B.C., November 8-10, 1977*. Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer nº 818. Ottawa (Ont.), Pêches et Environnement Canada, 1978, p. 54-63.

Norberg, T.J. et D.I. Mount. «A New Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) Subchronic Toxicity Test». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 4, 1985, p. 711-718.

Norberg-King, T. «An Interpolation Estimate for Chronic Toxicity: The ICp Approach». Unpublished manuscript. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, 1988. 12 p.

Norberg-King, T.J. «An Evaluation of the Fathead Minnow Seven-day Subchronic Test for Estimating Chronic Toxicity». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 8, 1989, p. 1075-1089.

Norberg-King, T.J. «Seven-day Tests and Chronic Tests. Author's reply.» *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, 1990, p. 1436.

Norberg-King, T.J. et J. Denny. «Culturing of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*): Supplemental Report for Video Training Tape». Report EPA/505/8-89/002b. Washington, DC, Environmental Protection Agency, Office of Water Enforcement and Permits, 1989. 22 p.

OCDE [Organisation de coopération et de développement économiques]. «Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques». Paris, OCDE, 1984.

Ontario. «Water Management: Goals, Policies, Objectives and Implementation Procedures of the Ministry of the Environment», édition révisée. Toronto (Ont.), ministère de l'Environnement de l'Ontario, juin 1989. 10 p.

Parrott, J.L. «Patterns of Sublethal Joint Toxicity Determined by Three Rapid Assays». Thèse de M.Sc. Guelph (Ont.), University of Guelph, 1988.

Pickering, Q.H. «Evaluation and Comparison of Two Short-term Fathead Minnow Tests for Estimating Chronic Toxicity». *Water Research*, vol. 22, 1988, p. 883-893.

Roberts, R.J. et C.J. Shephard. *Handbook of Trout and Salmon Diseases*, 2e éd. ISBN 0-85238-066-6. Surrey (Angleterre), Fishing News Books Ltd., 1986. 222 p.

Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts et R.H. Young. «Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish». Victoria (C.-B.), ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, 1982. 18 p.

Rottmann, R.W. et D.E. Campton. «Multiple-tank Aquarium System with Recirculating Water for Laboratory Studies of Freshwater Fishes». *Progressive Fish-culturist*, vol. 51, 1989, p. 238-243.

Rue, W.J., J.A. Fava et D.R. Grothe. «A Review of Inter- and Intralaboratory

Effluent Toxicity Test Method Variability». *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: 10th Volume*. ASTM STP 971. W.J. Adams, G.A. Chapman et W.G. Landis (éd.). Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, 1988, p. 190-203.

Scott, W.B. et E.F. Crossman. *Poissons d'eau douce du Canada*. Bulletin nº 184. Ottawa (Ont.), Office des recherches sur les pêcheries du Canada, 1973. 1026 p.

Sergy, G. «Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection». Edmonton (Alb.), Environnement Canada, juillet 1987.

Servizi, J.A. et R.W. Gordon. «Detoxification of TMP and CTMP Effluents Alternating in a Pilot-scale Aerated Lagoon». *Pulp & Paper Canada*, vol. 87, nº 11, 1986, p. 404-409.

Servizi, J.A. et D.W. Martens. «Some Effects of Suspended Fraser River Sediments on Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*)». *Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Population Biology and Future Management*. H.D. Smith, L. Margolis et C.C. Wood (éd.). Publication spéciale canadienne des sciences halieutiques et aquatiques nº 96. Ottawa (Ont.), Pêches et Océans Canada, 1987, p. 254-264.

Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng et D. Mackay. «Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: II. Multicomponent Systems - Hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, 1988, p. 125-137.

Silberhorn, E.M. Communication personnelle. Lexington, KY, University of Kentucky, Graduate Center for Toxicology, 20 janvier 1989.

Sprague, J.B. «Measurement of Pollutant Toxicity to Fish. I. Bioassay Methods for Acute Toxicity». *Water Research*, vol. 3, 1969, p. 793-821.

Stephan, C.E. «Methods for Calculating an LC50». *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. F.L. Mayer et J.L. Hamelink (éd.). ASTM STP 634. Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, 1977, p. 65-84.

Suter, G.W. II. «Letter to the Editor. Seven-day Tests and Chronic Tests». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, 1990, p. 1435.

Suter, G.W. II, A.E. Rosen, E. Linder et D.F. Parkhurst. «Endpoints for Responses of Fish to Chronic Toxic Exposures». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 6, 1987, p. 793-809.

Ward, R.W. et G.M. DeGraeve. «Acute Residual Toxicity of Several Wastewater Disinfectants to Aquatic Life». *Water Resources Bulletin*, vol. 14, 1978, p. 696-709.

Wilde, E.W., R.J. Soracco, L.A. Mayack, R.L. Shealy, T.L. Broadwell et R.F. Steffen. «Comparison of Chlorine and Chlorine Dioxide Toxicity to Fathead Minnows and Bluegill». *Water Research*, vol. 17, 1983, p. 1327-1331.

Wolf, E.G., M.J. Schneider, K.O. Schwarzmiller et T.O. Thatcher. «Toxicity Tests on the Combined Effects of Chlorine and Temperature on Rainbow (*Salmo gairdneri*) and Brook (*Salvelinus fontinalis*) Trout». BNWL-SA-5349. Richland, WA, Battelle Pacific Northwest Laboratories, 1975. 20 p.

Woltering, D.M. «The Growth Response in Fish Chronic and Early Life Stage Toxicity Tests: A Critical Review». *Aquatic Toxicology*, vol. 5, 1984, p. 1-21.

Zischke, J.A., J.W. Arthur, K.J. Nordlie, R.O. Hermanutz, D.A. Standen et T.P. Henry. «Acidification Effects on Macroinvertebrates and Fathead Minnows (*Pimephales promelas*) in Outdoor Experimental Channels». *Water Research*, vol. 17, 1983, p. 47-63.

Annexe A

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique

Gouvernement fédéral*

P. Wells (président actuel)
PE, Dartmouth (N.-É.)

R. McCubbin
St. John's (T.-N.)

K. Doe
Dartmouth (N.-É.)

W. Parker
Dartmouth (N.-É.)

N. Bermingham
Longueuil (Québec)

C. Blaise
Longueuil (Québec)

G. Elliott
Edmonton (Alberta)

R. Watts
North Vancouver (C.-B.)

K. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

B. Dutka
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

L. Porebski
Bureau de la gestion des déchets
Ottawa (Ontario)

D. MacGregor
Direction des produits chimiques commerciaux
Ottawa (Ontario)

R. Scroggins
Direction des programmes industriels
Ottawa (Ontario)

G. Sergy
Direction du développement technologique
Edmonton (Alberta)

E. Watt
Direction de la qualité des eaux
Ottawa (Ontario)

Gouvernements provinciaux

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte-Foy (Québec)

G. Westlake
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

W. Young
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique du Manitoba
Winnipeg (Manitoba)

K. Lauten
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique de la Saskatchewan
Regina (Saskatchewan)

---

* Environnement Canada, Conservation et Protection, au mois d'avril 1991.

J. Somers
Ministère de l'Environnement de l'Alberta
Vegreville (Alberta)

S. Horvath
Ministère de l'Environnement de la
Colombie-Britannique
Vancouver (C.-B.)

G. van Aggelen
Ministère de l'Environnement de la
Colombie-Britannique
North Vancouver (C.-B.)

Annexe B

Adresses de l'Administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection

Administration centrale
351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull (Québec)
K1A 0H3

Région de l'Atlantique*
15e étage, Queen Square
45, promenade Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région du Québec
1141, route de l'Église
C.P. 10100
Sainte-Foy (Québec)
G1V 4H5

Région de l'Ontario
25, avenue St. Clair est, 6e étage
Toronto (Ontario)
M4T 1M2

Région de l'Ouest et du Nord
Twin Atria nº 2, pièce 210
4999, 98e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon**
224, rue Esplanade
North Vancouver (C.-B.)
V7M 3J7

---

* Les programmes BOOTSTRP et TOXSTAT peuvent être reproduits sur une disquette formatée de 13 cm compatible IBM fournie par l'utilisateur. Pour les obtenir, communiquer avec la Division des laboratoires à cette adresse.

** Un programme informatique en BASIC pour le calcul de la CL_{50} peut être reproduit sur une disquette formatée de 13 cm compatible IBM fournie par l'utilisateur. Pour l'obtenir, communiquer avec le Laboratoire de toxicité aquatique à cette adresse.

Annexe C

Utilisation d'artémias pour l'alimentation de la tête-de-boule

On peut acheter des oeufs d'artémia dans les magasins de fournitures pour aquariums et dans la plupart des animaleries. On trouve également dans le commerce des systèmes dont l'utilisation est recommandée pour l'éclosion des oeufs d'artémia, qui se présentent généralement sous la forme d'un sac en plastique de forme allongée et de sels pour obtenir de l'eau d'une salinité de 15 mg/kg pour l'élevage de ces crustacés. Des instructions pour l'utilisation de l'appareil et pour l'éclosion des oeufs sont incluses. On peut cependant faire éclore les oeufs d'artémia dans presque n'importe quel contenant conique dans lequel l'air pénètre par la partie étroite au fond afin de conserver les oeufs en mouvement continu (Denny, 1987). Nous recommandons de suivre l'étude et les conseils détaillés de l'ASTM (1989) sur l'emploi des artémias.

Selon l'appareillage employé, le préparateur concentre en général les nauplius d'artémia éclos dans leur fluide d'élevage avant de les prélever. Pour l'alimentation durant l'essai de toxicité, il faudrait rincer les crevettes dans de l'eau douce afin d'éviter d'ajouter du sel dans les solutions d'essai. Le concentré de nauplius d'artémia dans leur milieu d'élevage devrait être rincé dans de l'eau douce à 25 °C dans une ampoule à décantation et reposer ensuite pendant deux minutes, au cours desquelles certains des oeufs non encore éclos pourraient remonter à la surface. Le concentré décanté de nauplius est ensuite transféré dans un petit becher ou contenant dont le fond est muni d'un filet à mailles de 20 µm, puis remis en suspension avant d'être distribué aux poissons à l'aide d'une pipette à répétition ou d'un compte-gouttes (Neville, 1989). En général, de 0,05 à 0,1 mL du concentré, c'est-à-dire une ou deux gouttes, suffisent pour une ration alimentaire destinée à un récipient d'essai contenant dix larves de poisson. Cette ration devrait contenir de 700 à 1 000 nauplius (Neville, 1989). Lors de la mise au point du protocole, il faudrait procéder à une vérification afin de déterminer combien de gouttes de concentré sont nécessaires pour fournir entre 700 et 1 000 nauplius par la technique particulière utilisée dans le laboratoire (pour ce faire, on estime le nombre contenu dans une aliquote au microscope, au moyen d'un hémocytomètre ou de tout autre dispositif approprié).

Il est essentiel que tous les récipients d'essai reçoivent la même quantité de nourriture et il faut mettre au point des techniques positives afin de s'en assurer, par exemple mélanger la suspension dans le petit becher et déterminer une durée et une position normalisées pour remplir le compte-gouttes et distribuer les nauplius. En outre, on devrait procéder à des inspections, en particulier durant les premiers stades des essais dans un laboratoire, afin de s'assurer qu'il reste toujours un léger excédent de nauplius dans les récipients durant le jour.

Deux distributions de nourriture chaque jour selon cette méthode devraient garantir une croissance quasi maximale, si l'une des rations est distribuée tôt le matin. Il est établi que deux rations produisent une meilleure croissance des larves qu'une seule ration, quoique la différence soit moins sensible si la ration unique est copieuse

(Silberhorn, 1989). Trois rations ne produisent pas de résultats supérieurs sur le plan de la croissance. La croissance augmente en fonction du nombre de nauplius par jour jusqu'à un plateau se situant aux environs de 2 000 nauplius par jour.

Dans le cas des aquariums contenant de grandes quantités de larves de tête-de-boule, il serait nécessaire d'augmenter le volume de concentré d'artémias en conséquence. Si l'on y dispense les artémias avec un flux continu d'eau fraîche, il n'est pas nécessaire de les rincer dans de l'eau douce avant de les distribuer.

Étant donné que les larves de tête-de-boule sont très sensibles et que les artémias constituent leur seule source de nourriture durant l'essai, les contaminants présents dans cette nourriture pourraient poser un problème réel, car leur action pourrait se combiner à celle des substances toxiques à expérimenter et fausser les résultats. Par conséquent, on devrait veiller particulièrement à utiliser des oeufs d'artémia qui ont, d'après des mesures, une faible teneur en contaminants, particulièrement en composés organochlorés persistants. L'EPA (1989) recommande de procéder à l'analyse chimique de chaque nouveau lot d'oeufs d'artémia, avec une limite maximale pour l'utilisation de 0,15 µg/g (poids frais) de chlore organique total. Elle recommande en outre d'utiliser des oeufs d'artémia provenant du Brésil ou de la Colombie, car ils ont de faibles teneurs en contaminants, et elle indique une source américaine où l'on peut s'en procurer. Comme les sources et les fournisseurs sont différents pour les artémias disponibles sur le marché canadien, nous ne les mentionnons pas ici. Les meilleurs indices de qualité seront fournis par la mesure des contaminants dans des oeufs provenant de sources différentes, par le taux de succès de l'éclosion des artémias et de la croissance des têtes-de-boule, et par des échanges d'informations à ce sujet entre les laboratoires.

La qualité nutritive des artémias peut également varier selon leur origine. Ce facteur est aussi difficile à évaluer de façon continue que la contamination; pour ce faire, on devrait tenir compte des sources et du succès de l'élevage et mettre en commun avec d'autres laboratoires les informations sur les valeurs nutritives mesurées.

Dans le cas des têtes-de-boule jeunes et adultes, on pourrait utiliser d'autres aliments que des artémias congelées. On pourrait obtenir des résultats satisfaisants ou supérieurs avec d'autres sortes d'invertébrés recueillis à l'état sauvage ou élevés, ou avec de la viande hachée fraîche ou congelée; toutefois, les artémias congelées sont pratiques et leur rendement est éprouvé.

Annexe D

Série logarithmique de concentrations convenant aux essais de toxicité*

Colonne (nombre de concentrations comprises entre 100 et 10, ou entre 10 et 1)**						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* Adapté de Rocchini *et al.* (1982).

** Une série de cinq concentrations ou plus peut être choisie dans une même colonne. Les points médians entre les concentrations de la colonne x se retrouvent dans la colonne $2x + 1$. Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage (volume ou poids), en mg/L ou en µg/L. Au besoin, elles peuvent être multipliées ou divisées par n'importe quelle puissance de 10. On peut se servir de la colonne 1 lorsqu'on est très incertain quant au degré de toxicité. On ne devrait pas employer de concentrations plus espacées (c.-à-d. séparées par un facteur supérieur à 3,2). Pour les essais d'effluents, on gagne rarement beaucoup en précision en choisissant des concentrations dans une colonne à droite de la colonne 3; les écarts moins larges des colonnes 4 à 7 peuvent être utiles à l'occasion pour l'essai de substances chimiques ayant un seuil d'effet abrupt.

Annexe E

Analyse de la mortalité en vue de l'estimation de la concentration létale 50

L'essai de croissance et de survie d'une durée de sept jours sur des larves de tête-de-boule est conçu pour être un essai sublétal sensible et significatif, car les premiers stades du cycle biologique sont généralement parmi les plus sensibles dans un essai couvrant l'ensemble du cycle vital. Par conséquent, cet essai vise normalement à calculer la CSEO et la CMEO (ou la moyenne géométrique de ces concentrations) ou la CI_p (*cf.* 4.5). Toutefois, la mortalité des larves de tête-de-boule représente un effet relativement sensible dans le cycle biologique et est parfois l'effet le plus sensible qui est signalé, en particulier lors d'une exposition d'une durée de sept jours (Woltering, 1982; McKim, 1985; Suter *et al.*, 1987). Par conséquent, il peut être utile de disposer d'une estimation ponctuelle de la concentration létale. Les méthodes d'estimation de la CL_{50} sont bien établies et fiables; voici quelques recommandations pour procéder à une telle estimation.

Une CL_{50} obtenue au cours du présent essai, qui porte sur des larves, serait bien inférieure aux CL_{50} aiguës normales pour la tête-de-boule que l'on retrouve dans les publications scientifiques, qui sont obtenues par des essais sur de jeunes poissons plus tolérants.

Afin d'évaluer la CL_{50}, on combine les données recueillies pour toutes les solutions de chaque concentration d'essai pour une exposition d'une durée donnée correspondant normalement à sept jours, soit à la durée de l'essai. Lorsque la mortalité n'est pas égale ou supérieure à 50 % dans au moins une concentration, il est impossible d'estimer la CL_{50}. Lorsque la mortalité est nulle à une certaine concentration, ce renseignement est appliqué à l'ajustement de la courbe de probit, cette valeur étant associée à un effet de 0 % de mortalité. Cependant, lorsque la mortalité est nulle dans une série de concentrations successives, une seule de ces valeurs devrait être utilisée pour l'évaluation de la CL_{50}; il s'agit du résultat associé à la plus forte concentration, c'est-à-dire celui qui est «le plus près du centre» de l'intervalle de distribution des données. De la même façon, s'il y avait une série de taux de mortalité de 100 % à des concentrations élevées dans un essai, une seule valeur correspondant à un effet de 100 % serait utilisée; une fois encore, ce serait celle qui est «le plus près du centre» de l'intervalle des valeurs, c'est-à-dire l'effet à la plus faible de ces concentrations. L'utilisation d'une seule valeur correspondant à 0 % et d'une seule valeur correspondant à 100 % d'effet s'applique à l'analyse des données par programme informatique ou par établissement manuel d'un graphique (*cf.* ci-après). L'utilisation de valeurs additionnelles de 0 % ou de 100 % pourrait fausser l'estimation de la CL_{50}.

On peut utiliser différents programmes informatiques pour calculer la CL_{50} et ses limites de confiance. Stephan (1977) a mis au point un programme de calcul de la CL_{50} qui fait appel à trois méthodes (des probits, de la moyenne mobile et binomiale) et l'a adapté aux ordinateurs personnels

compatibles IBM. Ce programme en BASIC est recommandé; avec la permission de M. Charles E. Stephan (EPA, Duluth, MN), il est possible d'en obtenir une copie en envoyant une disquette à Environnement Canada (*cf.* annexe B). Un programme efficace d'analyse des probits sur micro-ordinateur est également offert par M. J.J. Hubert (1987); en outre, on peut utiliser d'autres méthodes manuelles et informatiques qui donnent des résultats satisfaisants (APHA *et al.*, 1989; EPA, 1989). Des programmes qui font appel à la méthode abrégée de Spearman-Karber (Hamilton *et al.*, 1977) sont disponibles pour les ordinateurs personnels, mais nous ne les recommandons pas puisque les personnes qui ne connaissent pas bien les incidences de l'écrêtement des données dose-effet pourraient obtenir des résultats divergents.

Le programme de C.E. Stephan (1977), que nous recommandons, fournit des estimations de la CL_{50} et des limites de confiance selon chacune des trois méthodes qu'il utilise, pourvu que l'ensemble de données comprenne au moins deux cas où une partie des poissons sont morts. Avec des données uniformes ou régulières, les trois estimations seront sans doute semblables (*cf.* ci-après), et les valeurs fournies par l'analyse des probits devraient être préférées aux autres et consignées dans le procès-verbal de l'essai. L'estimation binomiale pourrait différer quelque peu des autres. Lorsqu'il n'y a pas, dans les résultats, deux cas où une partie des poissons sont morts, seule la méthode binomiale fonctionne; elle peut être appliquée à l'obtention de la meilleure estimation possible de la CL_{50}, avec des limites de confiance prudentes (larges).

Toute CL_{50} qui résulte de calculs informatiques devrait être vérifiée au moyen d'un graphique, sur échelle de probabilité logarithmique, du pourcentage de mortalité à un temps d'observation donné (p. ex., sept jours) aux différentes concentrations d'essai (APHA *et al.*, 1989; *cf.* exemple à la figure E.1). Tout écart important entre la CL_{50} estimée sur ce graphique et la valeur calculée par ordinateur doit être résolu.

Dans l'exemple théorique montré à la figure E.1, dix poissons ont été exposés à chacune de cinq concentrations (1,8, 3,2, 5,6, 10 et 18 mg/L) et à une solution de contrôle (où la mortalité a été nulle). Les pourcentages de mortalité correspondant aux nombres d'organismes morts (0, 2, 4, 9 et 10) ont été inscrits sur le graphique et on a tracé, à l'oeil, la droite de meilleur ajustement. On peut établir la concentration qu'on prévoit être létale pour 50 % des organismes en suivant la ligne pointillée à partir du niveau de 50 % jusqu'à son intersection avec la ligne ajustée, puis en passant à l'axe horizontal pour une estimation de la CL_{50}, soit 5,6 mg/L.

En traçant une droite comme celle de la figure E.1, on devrait attribuer relativement plus d'importance aux points qui sont proches de 50 % de mortalité. On peut se procurer du papier graphique de probabilité logarithmique («log-probit», comme à la figure E.1) dans toutes les bonnes librairies à vocation technique, ou en commander par leur entremise.

Les programmes informatiques ont donné des estimations très proches de celle fournie par le graphique de la figure E.1, établi à partir de données régulières.

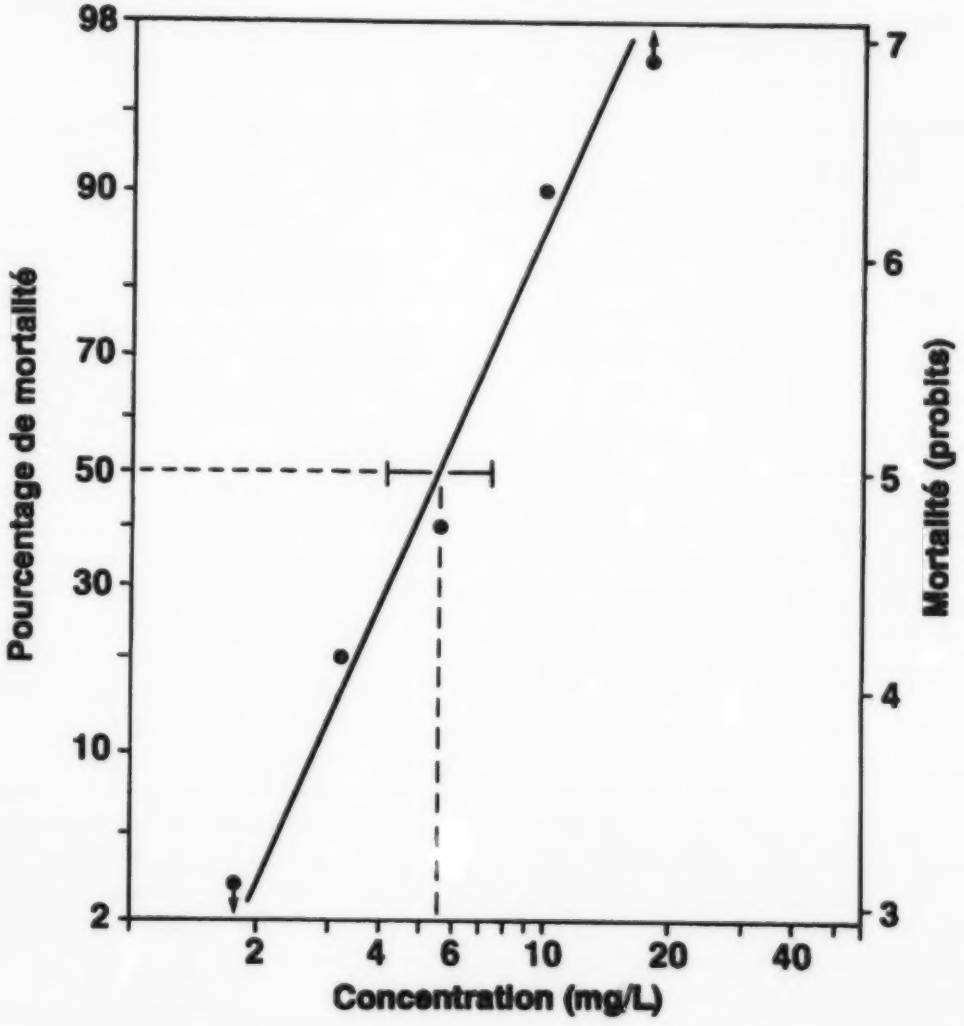


Figure E.1 Estimation d'une concentration létale 50 par la représentation graphique de la mortalité sur papier de probabilité logarithmique

Les CL_{50} (et les limites de confiance à 95 %) étaient les suivantes :

Analyse des probits de Hubert (1987) :		5,56	(4,28 - 7,21)
Stephan (1977) :	probits	5,58	(4,24 - 7,37)
	moyenne mobile	5,58	(4,24 - 7,33)
	binomiale	6,22	(1,8 - 10)
Méthode de Spearman-Karber :	écrêtement de 0 %	5,64	(4,38 - 7,26)
(Hamilton *et al.*, 1977)	écrêtement de 10 %	5,73	(4,34 - 7,58)
	écrêtement de 20 %	5,95	(4,34 - 9,80)

La méthode binomiale n'a pas donné d'estimation des limites de confiance, mais elle a permis de choisir deux concentrations d'essai comme limites extrêmes d'un intervalle à l'intérieur duquel se trouveraient les vraies limites de confiance.

On peut aussi, si on le souhaite, estimer le temps létal 50 (TL_{50}) à une concentration donnée. Pour cela, on trace un graphique semblable à celui de la figure E.1 en portant le logarithme du temps sur l'axe horizontal. Les temps précis à la mort des organismes pourraient être utilisés, mais ils sont rarement connus puisque les solutions d'essai ne sont pas surveillées en permanence. Le pourcentage cumulatif de mortalité aux différentes inspections successives (normalement, tous les jours) donne des résultats tout à fait satisfaisants pour l'établissement du graphique, et une droite ajustée à l'oeil permet d'estimer les limites de confiance lorsqu'on suit la démarche proposée dans Litchfield (1949). Lorsque les données le permettent, ces TL_{50} pourraient être estimés à partir de relevés successifs de la mortalité à intervalles de 24 h. La mortalité observée doit être supérieure à 50 % pour qu'on puisse estimer le TL_{50}.

Ni le TL_{50} ni le pourcentage de mortalité après de courts intervalles d'exposition ne constituent une méthode fiable pour établir la toxicité définitive; c'est pourquoi des comparaisons qui s'appuient sur ces résultats ne donnent que des indications semi-quantitatives. Toutefois, il pourrait parfois être utile d'indiquer si les substances soumises à l'essai ont un effet létal rapide ou lent. Ainsi, cela pourrait nous aider à établir si des dépassements de concentrations à court terme sont admissibles par rapport à une limite à long terme prévue dans un règlement. En principe, le fait d'établir un TL_{50} au lieu d'une CL_{50} peut conduire à une utilisation encore plus complète des résultats livrés par les essais, et une courbe de létalité qui prend le temps et la concentration comme paramètres pourrait se révéler utile pour l'examen des mécanismes d'effet des substances toxiques (Sprague, 1969; Suter *et al.*, 1987).